

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



2

(51) 国際特許分類6 C12N 9/10, 15/54	A1	(11) 国際公開番号 WO95/18217 (43) 国際公開日 1995年7月6日 (06.07.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02182 (22) 国際出願日 1994年12月22日 (22.12.94) (30) 優先権データ 特願平5/348260 1993年12月24日 (24.12.93) JP 特願平6/57369 1994年03月28日 (28.03.94) JP 特願平6/91507 1994年04月28日 (28.04.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) [JP/JP] 〒351-01 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 辻崇一 (TSUJI, Shuichi) [JP/JP] 黒澤信幸 (KUROSAWA, Nobuyuki) [JP/JP] 浜本敏郎 (HAMAMOTO, Toshiro) [JP/JP] 李泳春 (LEE, Yonug-Choon) [KR/JP] 中岡隆志 (NAKAOKA, Takashi) [JP/JP] 小島直也 (KOJIMA, Naoya) [JP/JP] 〒351-01 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内 Saitama, (JP)	(74) 代理人 弁理士 塩澤寿夫, 外 (SHIOZAWA, Hisao et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : NOVEL SUGAR-CHAIN SYNTHETASE AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME (54) 発明の名称 新規糖鎖合成酵素及びその製造方法 (57) Abstract Novel GalNAc α -2,6-sialyltransferases P-B1 and P-B3; GalNAc α -2,6-sialyltransferase P genes coding for the above transferases P-B1 and P-B3; and a protein of extracellular secretion type containing a polypeptide part that constitutes the active domain of the GalNAc α -2,6-sialyltransferase P-B1 or P-B3 and a signal peptide and catalyzing GalNAc α -2,6-sialic acid transfer. Also provided is a process for producing the sialyltransferases by efficiently recovering the sialyltransferases expressed in large quantities in microorganisms.		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

新規GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1およびP-B3、該GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1およびP-B3をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P遺伝子、及び、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1またはP-B3の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白が提供される。また、微生物中で大量に発現したシアル酸転移酵素を効率的に回収するシアル酸転移酵素の製造方法も提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BK	ブルキナ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GU	グアム	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MX	メキシコ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MY	マレーシア	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

新規糖鎖合成酵素及びその製造方法

技術分野

この発明は、糖鎖合成酵素および該酵素をコードするDNAに関するものである。さらに詳しくは、本発明は N-アセチルガラクトサミン α 2,6シアル酸転移酵素 (GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素) および該酵素をコードするDNAに関するものである。該酵素は、癌転移抑制およびウイルス感染抑止効果を有する薬剤として、あるいは薬剤にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための試薬等として有用である。

また、本発明は糖鎖合成酵素の製造方法に関するものである。さらに詳しくは、本発明はシアル酸転移酵素を微生物で発現させ、シアル酸転移酵素を大量に取得する方法に関するものである。

背景技術

シアル酸は、例えば細胞-細胞間伝達、細胞基質相互作用、細胞接着等の重要な生理作用をつかさどる物質である。発生、分化、及び癌遺伝子のトランスホメーション等の過程において調節をうけた、種々の異なる細胞表面シアル酸が存在することが知られている。

シアル酸は糖蛋白および糖脂質の炭化水素基の末端位置に存在しており、翻訳の後の過程で酵素的にCMP-Sia からこれらの部位に導入される。例えば、糖蛋白には3種の結合様式、すなわち Sia α 2,6Gal, Sia α 2,3Gal及びSia α 2,6GalNAc が共通に存在しており (Hakomori, S., Ann. Rev. Biochem., 50, pp.733-764, 1981) ガングリオシドには高頻度に2種の結合様式、すなわち Sia α 2,3Gal及びSia α 2,8Siaが存在している (Fishman, P., and Brady, R.O., Science, 194, pp.906-915, 1976)。

上記の様なシアル酸の酵素的導入(シアル酸転移)を担う酵素は、シアル酸転移酵素(sialyltransferase) と呼ばれるグリコシルトランスフェラーゼ類である。

従来既知の全てのシアリルオリゴ糖構造を合成するためには、少なくとも12の異なるシアル酸転移酵素が必要であることが知られている (Broquet, P. et al., *Int. J. Biochem.*, 23, 385-389, 1991; および Weinstein, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 17735-17743, 1987)。これらのうち、5種類のシアル酸転移酵素が精製されており、いずれの酵素も各受容体基質に対して高い特異性を示すことが知られている (Sadler, J. et al., *J. Bio. Chem.*, 254, pp.4434-4443, 1979; Weinstein, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 257, pp.13835-13844, 1982; Rearick, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 254, pp.4444-4451, 1979; 及び Joqiasse, D.H. et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 4941-4951, 1985)。

上記のシアル酸転移酵素をコードするcDNAについては、Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 (Gal β 4GlcNAc- α 6ST) をコードするcDNAが肝をはじめとする種々の組織からクローニングされている (Weinstein, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 262, pp.17735-17743, 1987; Grundmann U. et al., *Nucleic Acids Res.* 18, 667, 1990; Bast, B. et al., *J. Cell. Biol.*, 116, pp.423-435, 1992; および Hamamoto, T. et al., *Bioorg. and Medic. Chem.*, 1, pp.141-145, 1993)。また、Gal β 1,3GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素 (Gal β 3GalNAc- α 3ST) をコードするcDNA (Gillespie, W. et al., *J. Biol. Chem.*, 267, pp.21004-21010, 1992; 特表平5-504678号公報; および Lee, Y. et al., *Eur. J. Biochem.* 216, 377-385, 1993)、Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-シアル酸転移酵素 (Gal β 3(4)GlcNAc- α 3ST) をコードするcDNA (Wen, D. X et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 21011-21019, 1992; 及び Kitagawa, H. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 375)、および Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc α 2,3-シアル酸転移酵素をコードするcDNA (Sasaki, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 268, 22782-22787, 1993) もクローニングされている。

一方、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素については、この酵素を分離した報告もあるが (Hakomori, S., *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 733-764, 1981)、物質として同定できる程には精製されておらず、反応特異性、性質の安定性、供給量に問題があり、実用に供することはできなかった。また、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 (EC 2.4.99.3; GalNAc- α 6ST) をコードするcDNAはクローニングされていない。

いままで構造が明らかにされた上記のシアル酸転移酵素は、NH₂-末端領域に位置する疎水性セグメントを有しており、この疎水性セグメントにより細胞膜に経膜的に固定されるII型の経膜蛋白である。従って、シアル酸転移酵素遺伝子を含むベクターを哺乳類細胞にトランスフェクトして発現させると、発現した酵素が細胞膜に固定されてしまい、細胞外に分泌されないという問題があった。また、哺乳類細胞を用いて発現させると、細胞内酵素濃度が一定以上になると酵素の発現が低下するという問題がある。

このような問題を解決するために、シアル酸転移酵素の活性ドメイン部分とシグナルペプチド部分とを有する分泌型の融合蛋白を製造することもできる。この方法は、シアル酸転移活性を保持しシアル酸転移酵素として作用する蛋白を細胞外に分泌させるので、細胞培養液からシアル酸転移酵素を容易に調製できるという特徴がある。しかしながら、哺乳類の細胞を用いてシアル酸転移酵素を発現させた場合には、トランスフェクトした細胞が不安定であったり、細胞培養操作が煩雑になる場合がある。また、大量のシアル酸転移酵素を発現させるには長期にわたって大量の細胞を培養する必要があり、費用や設備の点で問題が生じる可能性もある。

一方、哺乳類細胞中に発現する酵素をコードする cDNA をクローニングし、酵素または酵素の可溶性蛋白をコードする遺伝子を含む組み替えベクターを製造して、該ベクターにより微生物を形質転換する方法は当業者に周知である。この方法により製造された形質転換体を培養することにより、目的の活性を保持する酵素あるいは可溶性酵素を微生物中で発現させて、目的の酵素を大量に生産することができる。

この方法は、例えば、形質転換された微生物を培養した後、微生物をリゾチーム等により溶菌して酵素を抽出する工程を含んでいる。しかしながら、短時間のうちに微生物の菌体内に大量の不溶性あるいは可溶性蛋白が発現するため、菌体内で蛋白が凝集して蛋白凝集物や沈殿物を形成することがあり、このような蛋白凝集物や沈殿物中から蛋白を抽出する必要があった。

上記の蛋白凝集物や沈殿物中から蛋白を抽出するためには、一般には尿素や塩酸グアニジンが用いる方法が採用されている。この方法では、尿素などにより蛋

白を一旦変性させて（疎水性部分を露出させて）可溶化したのち、さらに脱変性（renaturation）処理を行うのが一般的である。脱変性処理は透析によって尿素を除去することにより行われるが、尿素の除去に際して、それぞれの酵素に固有の至適条件（例えば、pH、塩濃度、温度等）を選択しなければならないという問題があり、この条件の選択に多大な時間を要するのが現状である。条件の設定を誤った場合には、回収された酵素には活性がほとんど残存しなくなるので、とりわけ脱変性処理の条件選択は重要である。

従って本発明は、精製されたGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素を提供することを目的とするものである。また本発明は、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAをクローニングし、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素をコードするDNA配列および該酵素のアミノ酸配列を提供することを目的としている。また、本発明は、上記のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素の活性ドメインを含む細胞外分泌型の蛋白を提供すること、並びに上記蛋白を微生物中で大量に発現させる方法を提供することを目的としている。菌体内に発現するシアル酸転移酵素の凝集物から該酵素を抽出して効率的に脱変性する方法を提供することも本発明のさらに別の目的である。

発明の開示

本発明者は上記の目的を達成すべく鋭意努力し、ニワトリ胚からGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAをクローニングし、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列により特定されるGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 を提供するものである。また、本発明は、上記のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子、およびその一態様である配列表の配列番号1に示される核酸番号1から1698で示される塩基配列を有するGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を提供するものである。さらに、上記のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター、およびその一態様であるプラスミド λ CEB-3034、上記の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体、並びに、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号233-566 により

特定されるGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインも提供される。

GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 は、蛋白に直接結合したN-アセチルガラクトサミンの3位の水酸基の置換の有無にかかわらずシアル酸を6位に転移する作用を有している。このため NeuAc α 2, 6GalNAc-蛋白の構造がしやすいが、これによってこの糖鎖の伸長は終結してしまう。従って、より長い糖鎖が望ましい場合には糖鎖が十分伸び切った後に初めてこの酵素を使うように糖鎖合成システムを設計する必要がある。このような理由から、3位の水酸基が置換されずに蛋白質に α グリコシド結合しているN-アセチルガラクトサミンに対してはシアル酸の転移を行わず、一方、3位の水酸基がガラクトースまたは還元末端側にガラクトースを有する糖鎖で置換されている場合にのみ、蛋白質に α グリコシド結合しているN-アセチルガラクトサミンの6位にシアル酸を転移させるシアル酸転移酵素は極めて有用である。

そこで本発明者は、ニワトリ精巣から上記の特徴を有するGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAをクローニングし、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列により特定されるGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B3 に係る発明を完成した。すなわち本発明は、上記のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B3 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子、およびその一態様である配列表の配列番号3に示される核酸番号1から1212で示される塩基配列を有するGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を提供するものである。さらに上記のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター、およびその一態様であるプラスミド λ CEB3-T20、ならびに上記組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

さらに本発明者は、上記のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素の構造のうち活性に係わる部分（活性ドメイン）を含む細胞外分泌型の蛋白を提供することを目的として研究を行った結果、上記のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分を特定することに成功し、該ポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2, 6-シアル酸転移を触媒する蛋白に係る発明を完成するに至った。その一態様として、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列により特定される蛋白 SB-690 が提供される。また、

上記蛋白をコードする遺伝子、およびその一態様として配列表の配列番号 2 に示される核酸番号 1 から 1065 で示される塩基配列を有する遺伝子、ならびに上記遺伝子を含む組み換えベクター、およびその一態様であるプラスミド pcDSB-690 が提供される。さらに上記の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体、および上記形質転換体を培養し、培養物から上記の蛋白を採取することを特徴とする上記蛋白の製造方法も提供される。

また本発明者は、不溶性形態のマウス Gal β 1,4GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素を大腸菌中で発現させた後、該酵素を尿素で抽出して至適条件で脱変性することにより、高度に活性の回復した Gal β 1,4GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素を製造できることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、シアル酸転移酵素の製造方法であって、以下の工程：(a) シアル酸転移酵素を微生物中で発現させる工程；(b) 菌体内に蓄積するシアル酸転移酵素を含む蛋白凝集物または沈殿物から該酵素を約 5～9 M の尿素により抽出する工程；(c) 上記工程(b) で得られた抽出物を脱変性用組成物で希釈して約 1～4 M の尿素を含む 1 次希釈物を得る工程；(d) 上記工程(c) で得られた 1 次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈して約 0.5～2 M の尿素を含む 2 次希釈物を得る工程；および(e) 上記工程(d) で得られた 2 次希釈物から透析により尿素を除去して脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含む方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

第 1 図 本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 をコードする cDNA クローンの制限酵素地図である。図中、E: EcoRI; RV: EcoRV; P: PstI; B: BglII を示す。

第 2 図 本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の疎水性分析の結果を示す図である。図中、左側が蛋白 N-末端であり、正の値は疎水性部分を示している。

第 3 図 本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の活性ドメインの位置と GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性を示し細胞外に分泌される蛋白 SB-690 との対比を示す図である。図中、蛋白 SB-BGL は GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性を示さない蛋白である。

第4図 本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 の一次配列をGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の一次配列と比較した図である。図中、アミノ酸は一文字標記で示してある。

発明を実施するための最良の形態

本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素の最も好ましい例としてGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 および P-B3 が提供される。以下、本明細書において本発明の酵素の一例としてGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 および P-B3 について詳細に説明するが、本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素はGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 に限定されることはなく、本発明により初めて明らかにされたGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1及び／又はP-B3の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変ないし修飾したGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性ドメインを有するGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素は、いずれも本発明の範囲に包含される。このような活性ドメインの好ましい例としては、例えば、配列表の配列番号1に開示したアミノ酸配列のアミノ酸番号233-566により特定されるGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性ドメインを挙げることができる。

GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 および GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3をコードするcDNAの単離方法は、それぞれ、以下の実施例に詳細に説明されている。もっとも、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 をコードするcDNAの単離方法は上記方法に限定されることはなく、当業者は下記の実施例に記載された方法を参照しつつ、あるいは、この方法を適宜修飾ないし変更することにより、容易に目的のcDNAを単離することができる。また、本発明の目的を達成するためには、配列表の配列番号1ないし3に記載された塩基配列を合成して用いることも可能である。

配列表の配列番号1に記載されたGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1をコードするDNA 及び配列番号3に記載されたGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B3をコードするDNA は、それぞれ本発明の好ましい態様であるが、本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 をコードするDNA またはGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素

P-B3をコードするDNAはこの特定の態様に限定されることはなく、本発明により明らかにされたGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 またはGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 のアミノ酸配列をコードするDNAは全て本発明の範囲に包含される。例えば、配列表の配列番号1に開示したアミノ酸配列の233-566により特定されるGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性ドメインをコードするDNAは本発明の好ましい態様である。また、配列表の配列番号1に開示した核酸配列の核酸番号699-1698により特定されるDNAは本発明の特に好ましい態様である。

本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素、例えばP-B1またはP-B3は、発現後に細胞内に留まり、細胞外に分泌されないことがある。また、細胞内濃度が一定以上になると、酵素の発現量が低下する可能性がある。上記のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 のGalNAc α 2,6-シアル酸転移活性を有効に利用するために、本酵素の活性を維持し、かつ発現時に細胞から分泌される可溶性形態の蛋白を製造することができる。このような蛋白として、上記のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性に関与する活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白を挙げることができる。

これまでにクローニングされたシアル酸転移酵素は、他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有している。すなわち、NH₂末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム領域、およびCOOH-末端の大きな活性ドメインを有する (Paulson, J.C. and Colley, K.J., J. Biol. Chem., 264, 17615-17618, 1989)。本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の経膜ドメインの位置を調べるために、カイト及びドゥーリトル (Kyte, J. and Doolittle, R.F., J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982) の方法に従って作成した疎水性分布図を利用することができる。また、活性ドメイン部分の推定には、各種のフラグメントを導入した組換えプラスミドを作成して利用することができる。このような方法の一例は本明細書の実施例に詳細に記載されているが、経膜ドメインの位置の確認や活性ドメイン部分の推定方法は、この方法に限定されることはない。

例えば、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白の製造のためには、例えばシグナルペプチドとして免疫グロブリンシグナルペプチド配列を用い、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1またはP-B3の活性ドメインに対応する配列を該シグナルペプチドにインフレーム融合させればよい。このような方法として、例えば、ジョブリンらの方法 (Jobling, S.A. and Gehrke, L., Nature (Lond.), 325, 622-625, 1987)を利用することができ、本明細書の実施例には、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 について、その具体的方法が詳細に説明されている。もっとも、シグナルペプチドの種類やシグナルペプチドと活性ドメインの結合方法は上記方法に限定されることはなく、当業者は、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素、このましくはGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分を適宜選択することができるし、それらを利用可能な任意のシグナルペプチドと適宜の方法により結合することにより細胞外分泌型の蛋白を製造することができる。このような蛋白の最も好ましい例として、本発明の蛋白SB-690を挙げることができる。

本発明の別の態様によれば、シアル酸転移酵素の製造方法であって、以下の工程：(a) シアル酸転移酵素を微生物中で発現させる工程；(b) 菌体内に蓄積するシアル酸転移酵素を含む蛋白凝集物または沈殿物から該酵素を約 5～9 M の尿素により抽出する工程；(c) 工程(b) で得られた抽出物を脱変性用組成物で希釈して約 1～4 M の尿素を含む 1次希釈物を得る工程；(d) 工程(c) で得られた 1次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈して約 0.5～2 M の尿素を含む 2次希釈物を得る工程；および(e) 工程(d) で得られた 2次希釈物から透析により尿素を除去して脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含む方法が提供される。上記のとおり、シアル酸転移酵素群は共通のドメイン構造を有しているので、本発明の製造方法は、あらゆる型のシアル酸転移酵素の製造に適用することが可能である。例えば、本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素や Gal β 1,4GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素などは、本発明の方法で好適に製造可能である。

上記発明の一態様は、工程(b) において約 8M の尿素を用い、工程(c) において約 2～3 M の尿素を含む 1次希釈物を得、工程(d) において約 1～2 M の尿素

を含む 2 次希釈物を得、さらに工程(e) において 2 次希釈物を 2 価のカチオンの存在下で透析する方法である。また、上記発明の別な態様は、工程(b) において約 8M の尿素を用い、工程(c) において 1 次希釈の後に 12 時間以上 4°C で放置して約 2~3 M の尿素を含む 1 次希釈物を得、工程(d) において 2 次希釈の後に 48 時間以上放置して約 1~2 M の尿素を含む 2 次希釈物を得、さらに工程(e) において 2 次希釈物を 2 価のカチオンの存在下で透析する方法である。また、上記工程(c) で用いる脱変性用組成物が 1~2M 尿素, 20 mM MOPS-NaOH, 0.5M NaCl, 20 mM ラクトース, 0.5 mM EDTA (pH 7.0) を含み、工程(d) で用いる脱変性用組成物が 20 mM MOPS-NaOH, 0.5M NaCl, 20 mM ラクトース, 0.5 mM EDTA (pH 7.0) を含む方法も好ましい方法である。

本発明のシアル酸転移酵素の製造方法の第一工程は、シアル酸転移酵素を微生物中で発現させる工程である。このような目的のためには、すでにクローニングされたシアル酸転移酵素遺伝子を利用することができる。シアル酸転移酵素をコードする cDNA としては、例えば、本発明の GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードする cDNA のほか、Gal β 1, 4GlcNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 (Gal β 4GlcNAc- α 6ST) をコードする cDNA (上記の Weinstein ら、Grundmann ら、Bast ら、および Hamamoto らの文献参照)、Gal β 1, 3(4)GlcNAc α 2, 3-シアル酸転移酵素 (Gal β 3(4)GlcNAc- α 3ST) をコードする cDNA (上記の Wen ら、および Kitagawa らの文献参照)、Gal β 1, 3GalNAc/Gal β 1, 4GlcNAc α 2, 3-シアル酸転移酵素をコードする cDNA (上記 Sasaki らの文献参照)、Gal β 1, 3GalNAc α 2, 3-シアル酸転移酵素 (Gal β 3GalNAc- α 3ST) をコードする cDNA (上記 Gillespie らの文献および特表平 5-504678 号公報; ならびに Lee らの文献参照) などを用いることができる。これらの核酸配列中に存在するシアル酸転移酵素遺伝子を天然型酵素の発現のためにそのまま利用してもよい。

また本発明では、上記の天然型シアル酸転移酵素の他、天然型シアル酸転移酵素のポリペプチド配列の一部が除去あるいは修飾された非天然型のシアル酸転移酵素を微生物中で発現させてもよい。例えば、シアル酸転移酵素は NH₂-末端領域に位置する疎水性セグメント (経膜領域) を有しているので、この疎水性セグメントを除去した可溶性形態のシアル酸転移酵素を微生物中で発現させることが好

ましい。さらに、疎水性セグメントおよびサイトゾル・セグメントを除去しておくことも好ましい。

シアル酸転移酵素の発現用の組み替えベクターを製造するために、例えば PCR 法によって天然型シアル酸転移酵素遺伝子の全配列あるいはその一部の領域を選択的に増幅することができる。例えば、開始コドンとクローニング・サイトを有し、サイトゾル・ドメインと経膜ドメインを欠くシアル酸転移酵素遺伝子(PCR断片)を容易に製造することができる。このようなシアル酸転移酵素遺伝子は開始コドンとクローニング・サイトを有しているので微生物発現用ベクターの導入に好適であり、天然型シアル酸転移酵素のポリペプチド配列の一部が除去された非天然型のシアル酸転移酵素をコードしているので、微生物中で非天然型の可溶性シアル酸転移酵素を発現させるので好ましい。

本発明の方法では、シアル酸転移酵素の発現のために、例えば大腸菌等の微生物を用いることができる。このような微生物を形質転換するために好適な微生物発現用ベクターは、当業者により適宜選択されうる。例えば、微生物として大腸菌 JM109(DE3) 等を用いた場合には、pET3b (Studier, F.W. et al., Method. Enzymol., 185, pp. 60-89, 1990)等の微生物発現用ベクターを用いることができる。上記のシアル酸転移酵素遺伝子を微生物発現用ベクターに導入する方法、および微生物を上記の組み替えベクターにより形質転換する方法は、いずれも当業者に周知である。

形質転換体の培養は、形質転換された微生物を培養する方法として当業者に周知の方法により行うことができる。目的のシアル酸転移酵素を微生物菌体内で効率的に発現させるために、例えば形質転換体の対数増殖期にT7-RNAポリメラーゼを誘導することにより、組み替え蛋白の産生を開始することができる。このようにして得られる形質転換体の菌体内には天然型シアル酸転移酵素あるいは非天然型シアル酸転移酵素が大量に発現されており、通常、シアル酸転移酵素は蛋白凝集物あるいは沈殿物を形成している。

本発明の方法の第二工程は、菌体内に蓄積したシアル酸転移酵素を含む蛋白凝集物または沈殿物からシアル酸転移酵素を 5~10 Mの尿素により抽出する工程である。シアル酸転移酵素を含む蛋白凝集物または沈殿物を菌体外に露出させて分

離するためには、培養した形質転換体を例えばリゾチームおよびTriton X-100等で処理した後、遠心処理により不溶性分画を集めればよい。その後に、沈殿をバッファー（例えば、10 mM Tris-HCl, pH 7.4）に蛋白濃度が 1~10mg/ml 程度となるように懸濁し、尿素による抽出操作を行う。

例えば、上記の懸濁液に最終濃度が 5-10M、好ましくは8Mとなるように固形尿素を加え、沈殿を15分間~2時間、好ましくは30分間にわたり 4~25℃、好ましくは10℃で抽出する。特定の理論に拘泥するわけではないが、上記の抽出液に含まれるシアル酸転移酵素の疎水性部分が尿素の作用によりが露出し、その結果、シアル酸転移酵素が可溶化して蛋白凝集物または沈殿物から抽出される。

その後、抽出液を例えば 12,000 ×g で 15 分間遠心して沈殿物を除去することにより、変性されたシアル酸転移酵素を含む抽出液を得ることができる。この抽出液は、一般に 0.5 mg/ml程度の蛋白を含んでいる。例えば、抽出に 5.7M 尿素を用いた場合には、約80% 程度の蛋白を回収することができる。また上記の抽出に際して、それぞれの最終濃度が 0.3M および 20 mMとなるように、NaCl と Tris-HCl (pH 7.4) を加えておくことが好ましい。なお、抽出操作の一例は以下の実施例に詳細に説明されている。

上記の抽出物に含まれるシアル酸転移酵素は疎水性部分が露出しており、高次構造が損なわれているので、本発明の方法では、第三工程として上記抽出物に含まれるシアル酸転移酵素の脱変性を行う。本明細書において、脱変性とは、抽出過程で損なわれた蛋白の高次構造を復元して酵素活性の一部または全部を回復させることをいう。この工程は、脱変性用組成物を用いて上記抽出物を段階的に希釈し、尿素濃度を徐々に低下させることにより効率的にシアル酸転移酵素の脱変性を行うことを特徴としている。

脱変性工程は、例えば、上記の抽出物を脱変性用組成物で希釈して 1~4 M の尿素を含む 1次希釈物を得る工程；1次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈して 0.5~2 M の尿素を含む 2次希釈物を得る工程；および 2次希釈物から透析により尿素を除去して脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含むものである。

その好ましい態様は、上記の抽出物を脱変性用組成物で希釈して 2~3 M の尿素を含む 1次希釈物を得る工程；1次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈して

1~2 M の尿素を含む 2 次希釈物を得る工程；および 2 次希釈物を 2 価のカチオンの存在下で透析して尿素を除去し脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含む方法である。また、さらに好ましい態様は、上記抽出物を脱変性用組成物で希釈した後に 12 時間以上 4℃ で放置して 2~3 M の尿素を含む 1 次希釈物を得る工程；1 次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈した後に 48 時間以上放置して 1~2 M の尿素を含む 2 次希釈物を得る工程；及び 2 次希釈物を 2 価のカチオンの存在下で透析して尿素を除去し脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含む方法である。

脱変性用組成物としては、例えば、2 M 尿素、20 mM MOPS-NaOH (MOPS: 3-モルホリノプロパンスルホン酸) (pH 7.0)、0.5 M NaCl、10 mM ラクトース、0.5 mM EDTA や、2 M 尿素、20 mM Tris-HCl、0.3 M NaCl、20 mM ラクトース、0.5 mM EDTA (pH 7.4) を用いることができ、さらに、後者の組成物の各成分を、例えば 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)；20 mM MOPS-NaOH (pH 7.0)；20 mM MES-NaOH (pH 6.0) (MES: 3-モルホリノエタンスルホン酸)；0.5 M NaCl；0.1 M NaCl；または 1 M 尿素のように変更した組成物を用いてもよい。また、尿素またはラクトースを含まない組成物を用いてもよい。これらのうち、2 M 尿素、20 mM MOPS-NaOH、0.5 M NaCl、20 mM ラクトース、0.5 mM EDTA (pH 7.0) を用いることが好ましい。NaCl の濃度が 0.1 M を下回る場合、あるいは pH が 9 を上回る場合には、脱変性効果が低下するので好ましくない。一般に、脱変性用組成物を添加した後の塩濃度を 0.3~0.5、pH を 6~8 とすることが好ましい。

最初の希釈操作は、上記の脱変性用組成物を用いて、上記抽出物の最終蛋白濃度が 0.01 ~ 0.05 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml となるような 1 次希釈物を得る操作である。例えば、上記抽出物を 10 ~ 40 倍、好ましくは約 20 倍程度に希釈すればよく、尿素の濃度を 1~4 M、好ましくは上限を 3M、あるいは下限を 2M 程度とする。希釈操作は一般に 4℃ で行うことが好ましい。この 1 次希釈混合物を、好ましくは 4℃ で 12 時間以上、特に好ましくは約 12 時間放置して、脱変性を徐々に開始させる。

上記の 1 次希釈物を、好ましくは尿素を含まない同容量の脱変性用組成物で希釈して、尿素濃度を半分程度にする 2 次希釈を行う。この希釈操作により 2 次希釈物中の尿素濃度を 0.5~2 M 程度、好ましくは上限を 2M、あるいは下限を 1M 程

度（例えば 1~2M）、特に好ましくは約 1.2M 程度にすべきである。この 2次希釈物を約 4℃で40時間~ 2週間、好ましくは48~72時間、特に好ましくは約48時間放置して脱変性を徐々に進行させる。

その後、脱変性を完全に行うために、上記の 2次希釈物を、例えば尿素を含まない脱変性用組成物に対して透析し、残存する尿素を完全に除去する。透析操作は、例えば4℃で 48 時間程度行うことができ、透析液としては、上記の脱変性用組成物の他、シアル酸転移酵素が安定に保存される緩衝液等を用いることができる。

また、上記の 1次希釈および 2次希釈工程、並びに最終の透析工程を 2価のカチオンの存在下で行うことにより、さらに脱変性効果を高めることができる。2価のカチオンとしてはマグネシウムイオン、マンガンイオン等を挙げることができる。これらは例えば 1~10 mM 程度、好ましくは 5 mM 程度の濃度で用いることができる。上記の透析工程を 2価のカチオンの存在下で行うことが特に好ましい。なお、最終の透析工程によって尿素を完全に除去する前にジチオスレイトールやメルカプトエタノール等の還元剤を配合すると、酵素活性が失われる場合があるが、尿素を完全に除去することにより酵素は還元剤に対する抵抗性を回復し、シアル酸転移酵素活性を示すようになる。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

実施例

(A) GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 の製造

GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 のcDNAクローンを得るために、2個の縮重オリゴヌクレオチド（ST-107及びST-205）によるPCR を、鋳型としてニワトリ胚cDNAを用いて行った。約 150bpの望ましいサイズのフラグメントを得た。PCR 組換産物の中で、CEB1と呼ばれるクローンは、Gal β 4GlcNAc- α 6STRL (180-225残基)、Gal β 3(4)GlcNAc- α 3STRL (158-203残基) 及びGal β 3GalNAc- α 3STPS (144-189 残基) の既知のシアルルモチーフとは異なる独特のアミノ酸配列を有していた。CEB1のシアルルモチーフであるGal β 4GlcNAc- α 6STRL、Gal β 3(4)GlcNAc - α 3STRL 及びGal β 3GalNAc- α 3STPS とCEB1の相同性は、それぞれ 56%、58% 及

び 60%であった。

CEB1からの cDNA インサートを用いての 6 日齢ニワトリ胚 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、いくつかの cDNA クローンを同定した。そのうちクローン λ CEB-3043 は 2.7 kb インサートを含んでいた (第 1 図)。別のオーバーラッピングクローンを得るために、ランダムプライムド cDNA ライブラリーを λ CEB-3043 の 5' - 末端の 0.8 kb EcoRI-BglII フラグメントとハイブリダイゼーションすることにより再スクリーニングを行った。この cDNA ライブラリーから 15 個のクローンが単離された。そのうちのクローン λ CEBHAD はクローン λ CEB-3043 の 5' - 末端と 160 bp に渡ってオーバーラップする 220 bp インサートを含んでいた。

これらの 2 個の cDNA を結合したものは、ヌクレオチド 1699 の TGA 停止コドンで終わる 1.7 kb のオープン・リーディング・フレームを含むものであった。ポリ(A) から 23 ヌクレオチド上流にあるポリアデニル化シグナル(AATAAA)は 3' 末端に存在している。このオープン・リーディング・フレームの翻訳により、通常の開始配列を持つヌクレオチド 1 のメチオニン残基(Kozak, M., Nature(Lond.), 308, 241-246, 1984)で開始し、分子量 64,781 の 566 アミノ酸から成る蛋白である本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 (実施例において、単に P-B1 と呼ぶことがある)が発現する。本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子を含む cDNA、本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子である λ CEB-3043 の塩基配列、および本発明の GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 のアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に示す。

ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)

PCR は Gal β 4GlcNAc- α 6STRL (Weinstein, J. et al., J. Biol. Chem., 262, 17735-17743, 1987)、Gal β 4GlcNAc- α 6STHP (Grundmann, U. et al., Nucleic Acids Res., 18, 667, 1990)、及び Gal β 3GalNAc- α 3STPS (Gillespie, W. et al., J. Biol. Chem., 267, 21004-21010, 1992) 中の保存領域に由来する縮重プライマー [5' プライマー ST107 : TGGGCCTTGGII(A/C)AGGTGTGCTGTTG 及び 3' プライマー ST205 : AGGCGAATGGTAGTTTTTG(A/T)GCCCACATC] を用いて行った。cDNA を得るために、3 日齢のニワトリ胚からの poly(A) リッチ RNA (2 μ g) を、オリゴ-dT

プライマー（ファルマシア社）；dATP、dCTP、dGTP、及びdTTPをそれぞれ 1 mM；並びに2 U/ μ l のRNase阻害剤（プロメガ社）と共に、50 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂及び 0.001% ゼラチン中 0°Cで 10 分間インキュベートした後、100 μ U のモロニー・ネズミ白血病ウィルス逆転写酵素(BRL)を加えてさらに42°Cで60分間インキュベートした。

上記反応液を94°Cで3分間加熱した後、0.2 μ g の poly(A)リッチRNA から製造したcDNAを、50 μ l 中に10 mM Tris-HCl(pH8.3)、50 mM KCl、1.25 mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPをそれぞれ 200 μ M、Taq DNA ポリメラーゼ（プロメガ社）を 2U、並びに 40 pmole の各 PCRプライマーを含む混合液中における PCR実験に用いた。35サイクルの PCR増幅を行い、各サイクルは 96°C、45秒間の熱変性；50°C、60秒間のアニーリング；及び72°C、60秒間の伸長とした。PCR生成物を 3% アガロースゲルで展開し、150bp に相当する DNAフラグメントをゲルから溶出し（キアエックス・キット、キアゲン社）、平滑末端化し、キナーゼ処理した後、pUC119のSmaI部位の中にサブクローニングし、最終的に配列決定した。

cDNAライブラリーの作成

全RNAをグアニジニウムチオシアネート法、及びそれに続く5.7 M CsCl溶液中における遠心によりニワトリ胚(6日齢) から調製した(Sambrook, J., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。poly(A)リッチRNA はオリゴテックス-dT30（宝酒造）で精製し、オリゴ-dT プライマー及びランダムプライマーに λ ZAPII（ストラタジーン社）及び cDNA 合成キット（ファルマシア社）を用いたcDNAライブラリーの作成に使用した。

cDNAライブラリーのスクリーニング

増幅されたcDNAライブラリー (1×10^8 ブラーク) をニワトリ胚 PCRフラグメントでスクリーニングした。ブラークを移したフィルターを、5 \times SSC、0.2% SDS、5 \times デンハルド溶液及び 10 μ g/ml変性サケ精子DNA 中で ³²P-放射性ラベル化 DNA プローブと65°Cで12時間にわたりハイブリダイズさせた。その後、2 \times SSC、0.1% SDS中で65°C、20分で二回洗浄した。単離されたファージクローンからブラ

スミドを得るために、ファージミドレスキューをλZAPII クローニングキットの製造元（ストラタジーン社）の使用説明書に従って行った。cDNAインサートは、Bluescriptプラスミドとして直接切り取った。プラスミドの作成はサムブルックら（Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual）によって述べられている分子クローニング標準法を用いた。

DNA 配列分析

上記のインサートのDNA 配列を、T7-DNAポリメラーゼの鋳型として一本鎖DNAを用いるジデオキシ鎖停止法（Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977）により決定した。シーケンシング反応及び電気泳動はオートリードDNA シーケンシングキット及びDNA シーケンサー（ファルマシア社）を用いて行った。一本鎖DNA は、ヘルパーファージR408（ストラタジーン社）で重複感染させた後に大腸菌XL-Blue（ストラタジーン社）から調製した。配列データは PC/Gene（テイジンシステムテクノロジー社）を用いたコンピューターで分析した。

ノーザン及びサザンブロッティング

遺伝子の存在を確認するために、ニワトリゲノム DNAのサザン・プロット分析を行った。λCEB-201 の EcoRI cDNA インサートとのハイブリダイゼーションを行い、EcoRI及び BamHIで切断した DNAでは単一のバンド、HindIII 及び SacIで切断した DNAでは2バンドが得られた。この単純なハイブリダイゼーションパターンによれば、クローニングされた cDNA が単一コピー遺伝子であることが明らかである。

また、胚発生過程における転写パターンを調べるために、ノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。6, 8, および10日齢のニワトリ胚由来RNAを分析したところ、3.0 および 2.2 Kb の2種のRNAが検出された。3.0 Kb転写が優勢であり、胚発生の全期間において常に発現していた。低レベルの2.2 Kb転写が6日齢の胚に検出されたが、8および10日齢の胚からは消失していた。ニワトリの脳、心臓、肝臓、胚、腎臓、及び精巣から得た10μg のポリAリッチRNAを用いて遺伝子発現を分析したところ、極めて低レベルの 3.0および4.0 Kbの転写が精巣に検出されたが、他の組織からはほとんど検出されなかった。各実験の

詳細は以下のとおりである。

ノーザンブロット用に、ニワトリ胚からの変性 poly(A)リッチRNA 5 μ g をホルムアルデヒド-アガロースゲル上でサイズ分画化した後、ハイボンド N+ ナイロンメンブレン (アマシャム社) 上にブロッティングさせた。サザンブロット用には、ニワトリ胚から調製した 7.5 μ g のゲノムDNA を制限酵素EcoRI、BamHI、HindIII 及びSacIで切断し、0.6% アガロースゲル上でサイズ分画化した。電気泳動の後、ゲルを 0.5 N NaOH 及び 1.5 M NaCl 中で変性 (30分間) させた後、0.5 M Tris-HCl (pH7.5) 及び 1.5 M NaCl 中で中性化し (30分間)、DNA をハイボンド N+ ナイロンメンブレン上に移した。ノーザン及びサザンフィルターは両方とも 50%ホルムアミド、5 \times SSC、5 \times デンハルド溶液、0.5% SDS及び10 μ g/ml 変性サケ精子DNA 中で37°C、1時間にわたりプレハイブリダイズさせた後に、プレハイブリダイゼーションと同じ条件で12時間、³²P-放射性ラベル化DNA プローブとハイブリダイズさせた。プローブとしては、マルチプライムラベリングシステム (アマシャム社) でラベルした λ CEB201である 0.6kb EcoRI cDNA インサートを用いた。フィルターを2 \times SSC 及び0.1% SDS中で65°C、10分で二回洗浄し、次いで0.2 \times SSC 及び0.1% SDS中で65°C、30分で二回洗浄した後、-70 °Cで約一日間、コダックXAR フィルムに感光させた。

上記のとおり説明された本発明のシアル酸転移酵素 P-B1 のアミノ酸配列は、従来公知のシアル酸転移酵素のアミノ酸配列には観察されない以下の特徴を示すものである。

(i) 従来クローニングされたシアル酸転移酵素は全てII型膜蛋白であり、それらは他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有する。すなわち、NH₂ 末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム領域、及び COOH-末端の大きな活性ドメインを有している。一方、本発明のシアル酸転移酵素 P-B1 は、大きなステム領域 (または中間領域) を有するものである。

(ii) 本発明のシアル酸転移酵素 P-B1 は、PEST領域 (233-258残基) を有している。細胞内半減期が2時間未満の蛋白のアミノ酸配列は、プロリン、グルタミン酸、セリン及びスレオニン残基が多い領域 (PESTと呼ばれる: Rogers, S. et al.,

Science, 234, 364-368, 1986) を1個以上含むことが知られている。これらの PEST領域は、一般にプラスの電荷を持つ数個のアミノ酸を含む集団を側面に擁している。従来公知のシアル酸転移酵素はこの領域を有していない。

(iii) 8 アミノ酸(SSSXVSTC)から成る領域が2カ所、247-254 残基及び 330-337 残基に見出された。他の蛋白のジーンバンクデータベースの検索からこの配列に類似する配列は明らかにされなかった。

従来より公知のシアル酸転移酵素は、驚くほど組織特異的発現を示すものであったが、これは細胞型特異的糖鎖構造の存在に相関しているものと考えられている (Paulson, J.C. and Colley, K.J., J. Biol. Chem., 264, pp.17615-17618, 1989)。ノーザン・ブロットィングの結果によれば、シアル酸転移酵素 P-B1 の mRNAの発現パターンが変化することが明らかである。シアル酸転移酵素P-B1の遺伝子から3種の異なるサイズのmRNA (4.0、3.0 及び 2.2 kb)が転写されることは、それらがGal β 1, 4GlcNAc- α 2, 6-シアル酸転移酵素(Gal β 4GlcNAc- α 6STRL) 及びGal β 1, 3(4)GlcNAc α 2, 3-シアル酸転移酵素 (Gal β 3(4)GlcNAc- α 3STRL) (Weinstein, J. et al., J. Biol. Chem., 262, 17735-17743, 1987; 及びWen, D.X. et al., J. Biol. Chem., 267, 21011-21019, 1992)に観察されたような、選択的スプライシングメカニズム及び選択的プロモーター利用メカニズムを通じて発現されることを示唆している。このことは、シアル酸転移酵素 P-B1 に対しては単一コピーの遺伝子しか存在しないことがサザン・ハイブリダイゼーションにより示されていることから明らかである。

(B) 可溶性形態の蛋白 SB-690 の製造

本発明のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移活性を利用するため、本酵素の活性を維持し、かつ、発現時に細胞から分泌される可溶性形態の蛋白 SB-690 を製造した。

これまでにクローニングされたシアル酸転移酵素は、他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有している。すなわち、NH₂ 末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム(stem)領域、及び COOH-末端の大きな活性ドメインを有する。本発明のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素の経膜ドメインの位置を調べるために、疎水性分布図を

カイト及びドゥーリトル (Kyte, J. and Doolittle, R.F., J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982)の方法に従って翻訳された配列から作製した(第2図)。この結果、本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の疎水性経膜ドメインはアミノ酸番号17から37の21アミノ酸残基であることが示唆された。

上記のとおり、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素の疎水性シグナルアンカードメインはアミノ酸残基17から37に位置している。鑄型として pSB-BGLを含むインビトロの翻訳/転写系では蛋白(33 kDa)が合成されるにもかかわらず、pcDSB-BGLでトランスフェクションした細胞からの培地は有意の活性を持たないことから、233 から269 残基が酵素活性に対して何らかの必須残基を含むことが明らかであり、活性ドメインは 233-566の周辺と推定された(第3図)。これはクローニングされた他のシアル酸転移酵素のものに匹敵するサイズである。上記の活性ドメインを含む可溶性蛋白を作るために、P-B1の推定活性ドメインに対応する配列を免疫グロブリンシグナルペプチド配列にインフレーム融合させた(Jobling, S.A. and Gehrke, L., Nature(Lond.), 325, 622-625, 1987)。以下に実験の詳細を示す。

ベクタープラスミド pUGS を、pBluescript SK(+) プラスミドの PstI-XhoI フラグメントを 117 bp の合成DNA フラグメントで置換することにより作成した。このフラグメントは、5' 末端に合成PstI部位を持つ43 bp のアルファルファモザイクウィルス(Jobling, S.A. and Gehrke, L., Nature(Lond.) 325, 622-625, 1987) の 5' - 非翻訳(untranslated)リーダー配列を含んでおり、この配列には 3' 末端に17 bp の合成EcoRI、BglII 及びXhoI クローニング部位を持つマウス免疫グロブリン M重鎖シグナルペプチド配列(57 bp)(Boersch-Supan, M.E. et al., J. Exp. Med. 161, 1272-1292, 1985)が続いている。このフラグメントのヌクレオチド配列は 5'-CTGCAGGCTTTTATTTTAAATTTCTTTCAAATACTCCACCATGAAATTCAGCTGGGTCATGTTCTTCTGATGGCAGTGGTTACAGGGTCAATTCAGAATTCAGATCTCGAG-3' である。

本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子である λ CEB-3043をEcoRVで部分切断し、1.8 kbのフラグメントをpBluescript SK(+)のEcoRV部位にサブクローニングして、pCEB-1800を生産した。このクローンは λ CEB-3043

の0.8 kbの3'-非翻訳領域を欠くものである。

GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の活性ドメインを5'-プライマーとしてその中央部分に合成EcoRI 部位を持つ5'-AGGGCTGCTGAATTCAGCCACAG-3' (ヌクレオチド 679-708)、および3'ユニバーサル M13シーケンシングプライマー、さらに鋳型としてpCEB-1800 を用いたPCR によって生産した。このPCR 産物をEcoRI 及びXhoIで切断した後、上記ベクタープラスミドpUGSの EcoRI/XhoI 部位に結合させてプラスミドpSB-690 を得た。このプラスミドには、 λ CEB-3034 遺伝子のうちGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の活性ドメインをコードする領域が免疫グロブリンシグナル配列の3' 末端にインフレーム融合された配列が含まれるものである。この融合フラグメントをPstI及びXhoIで pSB-690から切り取った後、pcDSR α 発現ベクターの PstI/XhoI部位中に挿入して pcDSB-690を得た。

対照として、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の活性ドメインの一部を欠く蛋白であるSB-BGLを以下のとおり製造した。pCEB-1800 及びpUGSをBglII で切断し、粘着末端を DNAポリメラーゼのクレノウ(Klenow)フラグメントを用いて充填した。DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントを熱変性させた(94°C、20分間)後、これらのプラスミドをXhoIで切断した。pCEB-1800 からの1.0 kb フラグメントをゲル精製し、pUGSの平滑末端を持つBglII/XhoI部位中にサブクローニングしてプラスミドpSB-BGL を得た。pSB-BGL からの PstI/XhoIフラグメントをpcDSR α の発現ベクターの PstI/XhoI部位中でサブクローニングして pcDSB-BGLを得た。

上記の蛋白の発現は以下のように行った。COS-7 細胞に DEAE-デキストラン法 (McCutchan, J.H. and Pagano, J.S. J. Natl. Cancer Inst. 41, pp.351-357, 1968) を用いて5 μ g のプラスミドDNA によりトランスフェクションした。48時間のトランスフェクションの後、培地を回収し、セントリコン30フィルター(アミコン社)を用いて酵素アッセイ用に10倍に濃縮した。代謝ラベル用に、COS 細胞(60-mm 培養皿)をMet- フリーの培地(ダルベッコの改良イーグル培地及び2%ウシ胎児血清)(GIBCO)で洗浄した後、同じ培地で1時間インキュベートした。細胞を1.5 ml の Met- フリーの培地中 10 MBq/皿のエクスプレス³⁵S プロテ

ンラベリングミックス（デュボン・ニューイングランドヌクレア社）で2時間、パルスラベルした。これらの細胞をその後 Met⁻ フリーの培地で洗浄し、エクスプレスラベルなしの培地中で5時間チェイスした。分泌された蛋白を含む培地を回収し、10倍に濃縮した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、次いでフルオログラフィーに掛けた。

発現した蛋白の酵素活性を以下のようにして測定した。アクセプターとしてオリゴサッカライド及びグリコプロテインを用いたアッセイを、総量が10 μ l となる 50 mM カコジル酸ナトリウムバッファー (pH 6.0)、50 μ M CMP-[¹⁴C]-NeuAc (0.9 Bq/pmol)、1 mg/ml ウシ血清アルブミン、2 mg/ml アクセプター基質及び 1 μ l 濃縮 COS細胞培地の存在下で行い、30°Cで2時間インキュベートした。インキュベート時間終了時に、アッセイ混合液 1 μ l をシリカゲル60HPTLCプレート（メルク社、ドイツ）にのせた。このプレートをエタノール：ピリジン：n-ブタノール：水：酢酸 (100:10:10:30:3) で展開し、放射能活性を BAS2000 ラジオイメージアナライザー（富士写真フィルム製、日本）で可視化して定量した。原点に残った放射能はシアル化糖蛋白と見なした。

シアル化産物の同定は以下のように行った。アシアロ-BSMを pcDSB-690 COS細胞培地中でCMP-[¹⁴C]-NeuAcで再シアル化して還元し、 β -除去オリゴサッカライドを製造した。 β -除去はカールソンの方法(Carlson, D.M., J. Biol. Chem., 243, 616-626, 1968)に従って行った。アシアロ-BSM (各 100 μ g)を、インキュベーション時間が12時間であることを除き、上記と同じ条件下で pcDSB-690 COS細胞培地中でCMP-[¹⁴C]-NeuAc でシアル化した。反応を 0.5 M HCl中 1% リンタングステン酸 500 μ l を加えて停止し、次いで 10,000 \times g で5分間遠心した。ペレットを同じリンタングステン酸溶液で一回洗浄し、さらにメタノールで一回洗浄した後、0.5 mlの0.05M NaOH及び 1M NaBH₄ 溶液中に溶解し、45°Cで30時間インキュベートした。

インキュベーション時間の終了時に、この溶液を酢酸で pH 6 に中和し、凍結乾燥した。この乾燥産物を 50 μ l の水に溶解し、水で平衡化及び溶出するセフデックス G-15 カラム (0.5 x 5 cm) 上のゲル濾過によって脱塩した。放射能活性のある分画はそれ以上精製せずに産物同定用の薄層クロマトグラフィーに付

した。異なる2種類の展開溶媒を用い、天然 BSMからの NeuAc α 2, 6GalNAc-オール及びGlcNAc β 1, 3[NeuAc α 2, 6]GalNAc-オールと共泳動させた。転移したシアリル残基の比率は 1:0.9:0.6であった。シアリ化GalNAc-SerNAc を異なる2種類の展開溶媒系において NeuAc α 2, 6GalNAc-SerNAcと共泳動させることにより、本発明の蛋白 SB-690 が、グリコプロテイン中の Ser又は Thr残基に直接結合している GalNAc に NeuAc α 2, 6 結合を形成することが示された。

pcDSB-690 でトランスフェクトされた細胞を培養した培地にはシアル酸転移酵素活性が検出され、pcDSB-690により発現される本発明の蛋白 SB-690 がシアル酸転移酵素活性を保持しつつ、細胞外に分泌されていることが明らかになった。一方、cDSB-BGLでトランスフェクトされた細胞を培養した培地からはシアル酸転移酵素活性が検出されなかった。

本発明の蛋白 SB-690 の受容体特異性を pcDSB-690でトランスフェクションされた COS-7細胞培養濃縮培地で調べた。表1に示すように、アシアロムチン、フェツイン及びアシアロフェツインは良好な受容体として作用した。注目すべきことに、フェツインはアシアロフェツインよりも優れた受容体であることが示された(Baubichon-Cortay, H. et al., Carbohydr. Res., 149, 209-223, 1986; および Brockhausen, I. et al., Biochemistry, 29, 10206-10212, 1990)。他のグリコプロテイン、オリゴサッカライド及びグリコリピッドは GalNAc-SerNAcを除いて、アクセプターとして作用しなかった。これらのデータは当アクセプター部位が α -グリコシド結合を通じてグリコプロテイン中の Ser又は Thr残基に直接結合している GalNAc であることを示唆している。

表1 本発明の蛋白 SB-690 の受容体特異性

受 容 体	pmoles/hr/10 μ l 培地
フェツイン (fetuin)	142
アシアロフェツイン (asialo-fetuin)	96
α 1 酸糖蛋白	6
アシアロ- α 1 酸糖蛋白	4
ウシ下顎ムチン	15
ウシ下顎アシアロムチン	186
卵ムコイド	7
アシアロ- 卵ムコイド	0
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	0
Gal β 1,4GlcNAc	0
Gal β 1,3GalNAc	0
GalNAc β 1,4Gal	0
Gal β 1,4Glc	0
ガラクトース	0
ガングリオシド混合物	0
ガングリオシド GD1a	0
GalNAc-SerNAc	4
ベンジル-GalNAc	2

表中、“0” は 1 pmole/hr/10 μ l 培地未満であることを示す。

従来クローニングされたシアル酸転移酵素は Gal-部分に対してのみアクセプター特異性を示すものであった。一方、本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1および本発明の蛋白SB-690は、GalNAc- 部分に対してアクセプター特異性を示すが Gal-部分に対してはアクセプター特異性を示さないものである。以下の知見は、本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 および本発明の蛋白 SB-690 が、 α 2,6-結合を有する CMP-NeuAcを、グリコプロテインの Thr/Serに O-結合している GalNAc-残基上に転移させる GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素活性を有することを示すものである。

(i) COS細胞中の pcDSB-690の発現によりThr/Ser 残基に結合している GalNAc

部分のみに対するアクセプター特異性が明らかにされた。一方、試験した他の基質に対しては検出可能な酵素活性は全く見られなかった(表1)。

(ii) ウシ下顎腺アシアロムチン及びGalNAc-SerNAc から得られたシアル化産物は $\alpha 2,6$ 結合を通じてGalNAc部分に結合しているシアル酸を有することが示された。

2種類の型、すなわちウシ下顎腺型及び肝臓(脳)型の GalNAc- $\alpha 6$ ST が報告されており、それらは異なるアクセプター特異性を持つ(Bergh, M. E. et al., J. Biol. Chem., 258, 7430-7436, 1983)。前者の酵素はGalNAc、Gal $\beta 1,3$ GalNAc 及び NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GalNAc に対して広範囲の特異性を持つが、後者はグリコプロテインの NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GalNAc 部分に対してのみ特異性を持つ。本発明のGalNAc $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素 P-B1 および本発明の蛋白 SB-690 のアクセプター特異性は、前者の酵素と同様であることを示している。

アシアロムチンのアクセプター部位の検討から NeuAc $\alpha 2,6$ GalNAc-Ser/Thr が最も多い産物であることが示された。しかし、ウシ下顎腺アシアロムチン中の糖共役体の比率、すなわち、GalNAc-Ser/Thr、GlcNAc $\beta 1,3$ GalNAc-Ser/Thr および Gal $\beta 1,3$ GalNAc-Ser/Thr がそれぞれ 65%、25% 及び 5% に当たること(Tsuji, T. and Osawa, T., Carbohydr. Res., 151, pp.391-402, 1986)を考慮すると、本発明のGalNAc $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素 P-B1 および本発明の蛋白 SB-690 は、以下のアクセプター優先順位を有するものである: Gal $\beta 1,3$ GalNAc-Ser/Thr > GlcNAc $\beta 1,3$ GalNAc-Ser/Thr > GalNAc-Ser/Thr。一方、ほとんど全ての放射能活性が弱アルカリ処理によって解離し、かつ、フェツインの方がアシアロフェツインよりも好ましい(表1)という事実は、ウシ肝臓(Bergh, M. E. et al., J. Biol. Chem., 258, 7430-7436, 1983)、およびラット脳(Baubichon-Cortay, H. et al., Carbohydr. Res., 149, pp.209-223, 1986)のGalNAc $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素について報告されているように、NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GalNAc-Ser/Thr が Gal $\beta 1,3$ GalNAc-Ser/Thr よりも好ましい基質であることを示している。

GalNAc-SerNAc のシアル化はアシアロムチン上の対応する残基のシアル化よりもはるかに遅い(表1)。ブロックハウゼンらによれば(Brockhausen et al., Biochemistry, 29, 10206-10212, 1990)、最低5アミノ酸の長さが有効なシンセ

ターゼ活性にとって必要である。本発明のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 および本発明の蛋白 SB-690 も、ペプチド部分に同様の直接作用を有するものと思われる(表1)。

なお、上記の製造例(A) および(B) に用いた試薬等は以下の通りである。フェツイン、アシアロフェツイン、ウシ下顎腺ムチン、 α 1-酸グリコプロテイン、ガラクトース β 1, 4-N-アセチルガラクトサミン、CMP-NeuAc、ラクト-N-テトラオース、ベンジル-GalNAc、N-アセチルラクトサミン、及びトライトンCF-54 はシグマ社(セント・ルイス、USA)から入手した。CMP-[14 C]NeuAc(11GBq/mmol) はアマシャム社(U.K.)から入手したものである。N-アセチルガラクトサミン β 1, 4-ガラクトースは梶本博士(理化学研究所、日本国埼玉県和光市)より寄贈されたものを用いた。2-アセトアミドおよび2-デオキシガラクトシル α N-アセチルセリン(GalNAc-SerNAc) は、グランドラー及びシュミット(Grundler G., and Schmidt R.R., Liebigs Ann. Chem., 1984, 1826-1847, 1984)の方法によって合成した。NeuAc α 2, 6-GalNAc-SerNAc は NeuAc α 2, 6GalNAc-Ser(メクト社) からピリジン水中で無水酢酸でアセチル化によって製造した。NeuAc α 2, 6GalNAc-オール及びGlcNAc β 1, 3 [NeuAc α 2, 6]GalNAc-オールは辻および大沢(Tsuji, T. and Osawa T., Carbohydr. Res., 151, 391-402, 1986)の方法によってウシ下顎腺ムチンから製造し、270MHz 1 H 及び 13 C NMRにより同定した(Savage, A.V. et al., Eur. J. Biochem., 192, pp.427-432, 1990; 及び Savage, A.V. et al., Eur. J. Biochem., 193, 837-843, 1990)。合成プライマーはアプライド・バイオシステム394DNAシンセサイザーで合成した。制限酵素SmaI、EcoRI、BamHI、HindIII、SacI、XhoI、BglII 及びPstIは宝酒造から入手した。

(C) GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B3 の製造

GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素のcDNAクローンを得るために、2個の縮重オリゴヌクレオチド(ST-107及びST-205)によるPCRを鋳型としてニワトリ胚cDNAを用いて行った。約150bpの望ましいサイズのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した。このPCR産物の塩基配列の決定を行ったところ、Gal β 1, 4GlcNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素(Kurosawa, N., et al., Eur. J. Biochem., 219, 375-381, 1994)、及びGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 をコードする

PCR産物の他に、新規アミノ酸配列をコードするPCR産物としてpCRB3が得られた。pCRB3のシアリルモチーフと上記の各シアル酸転移酵素のシアリルモチーフとの一致度は、65%-57%であった。

該遺伝子の完全なコード領域を確認するために、幼ニワトリ精巢のcDNAライブラリーをpCRB3のcDNAインサートでスクリーニングした。5×10⁵個の別々のクローンについてスクリーニングしたところ、インサートサイズが2.05 kbであるポジティブクローンλCEB3-T20が得られた。

このcDNAクロンのヌクレオチド配列は、45.8 KDaの分子量を持つ404アミノ酸をコードする1212bpのオープンリーディングフレームを含んでいた。このオープンリーディングフレームは、通常の翻訳開始配列(Kozak, M., Nature, 308, 241-246, 1984)を持つヌクレオチド1位のメチオニンコドンで始まり、ヌクレオチド1213位のTGA停止コドンで終了している。また、384 bpの5'非翻訳配列及び451 bpの3'非翻訳配列に挟まれている。開始部位の5' DNA配列は、3個のリーディングフレームの全てに停止コドンを含んでいる。λCEB3-T20のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列を配列表の配列番号1に示した。このアミノ酸配列を有するGalNAcα2,6-シアル酸転移酵素をP-B3と命名した。

上記のGalNAcα2,6-シアル酸転移酵素P-B3 (GalNAcα2,6-シアル酸転移酵素P-B1をST6GalNAcAと呼ぶ場合、本酵素をST6GalNAcBと呼ぶこともある)は、現在までにクローニングされている全てのシアル酸転移酵素に見られているように、荷電した残基に接する17アミノ酸のN-末端疎水性配列を含むII型の経膜ドメインを有している。GalNAcα2,6-シアル酸転移酵素P-B3の一次配列をDNA及び蛋白データバンクの他のアミノ酸配列と比較したところ、クローニングされている全てのシアル酸転移酵素と二領域で類似性を有することが明らかになった。

GalNAcα2,6-シアル酸転移酵素P-B3の中心部にある一方の領域(シアリルモチーフL)は45アミノ酸から成り64-24%の配列一致度を示す。他方、COOH末端部分にあるもう一つの領域(シアリルモチーフS、333-355残基)は78-43%の一致度を示す。GalNAcα2,6-シアル酸転移酵素P-B3の全体的アミノ酸配列一致度は、それぞれ、ニワトリのGalβ1,4GlcNAcα2,6-シアル酸転移酵素(Kurosawa, N., et al., Eur. J. Biochem., 219, 375-381, 1994)に対して10%、ニワトリ

の Gal β 1,3GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素 (Kurosawa, N. et al., Biochem. Biophys. Acta., 発行中) に対して 13%、及びニワトリの ST6GalNAcA(22) に対して 32% であった。これらの結果は、クローニングされた該遺伝子がシアル酸転移酵素遺伝子ファミリーに属することを示すものである。

実験の詳細は以下のとおりである。

ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)

PCR は Gal β 4GlcNAc- α 6STRL (Weinstein, J. et al., J. Biol. Chem., 262, 17735-17743, 1987)、Gal β 4GlcNAc- α 6STHP (Grundmann, U. et al., Nucleic Acids Res., 18, 667, 1990)、及び Gal β 3GalNAc- α 3STPS (Gillespie, W. et al., J. Biol. Chem., 267, 21004-21010, 1992) 中の保存領域に由来する縮重プライマー [5' プライマー ST107 : TGGGCCTTGGII(A/C)AGGTGTGCTGTTG 及び 3' プライマー ST205 : AGCGCAATGGTAGTTTTTG(A/T)GCCCACATC] を用いて行った。cDNA を得るために、3 日齢のニワトリ胚からの poly(A) リッチ RNA (2 μ g) を、オリゴ-dT プライマー (ファルマシア社); dATP、dCTP、dGTP、及び dTTP をそれぞれ 1 mM; 並びに 2 U/ μ l の RNase 阻害剤 (プロメガ社) と共に、50 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、および 0.001% ゼラチン中、0 °C で 10 分間インキュベートした後、100 μ U のモロニー・ネズミ白血病ウィルス逆転写酵素 (BRL) を加えてさらに 42 °C で 60 分間インキュベートした。

上記反応液を 94 °C で 3 分間加熱した後、0.2 μ g の poly(A) リッチ RNA から製造した cDNA を、50 μ l 中に 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.25 mM MgCl₂、0.001% ゼラチン、dATP、dCTP、dGTP、及び dTTP をそれぞれ 200 μ M、Taq DNA ポリメラーゼ (プロメガ社) を 2U、並びに 40 pmole の各 PCR プライマーを含む混合液中における PCR 実験に用いた。35 サイクルの PCR 増幅を行い、各サイクルは、96 °C、45 秒間の熱変性; 50 °C、60 秒間のアニーリング; 及び 72 °C、60 秒間の伸長とした。PCR 生成物を 3% アガロースゲルで展開し、150bp に相当する DNA フラグメントをゲルから溶出した (キアエックス・キット、キアゲン社)。このフラグメントを平滑末端化してキナーゼ処理した後、pUC119 の SmaI 部位の中にサブクローニングし、最終的に配列決定した。

cDNA ライブラリーの作成

全RNA をグアニジニウムチオシアネート法: 及びそれに続く 5.7 M CsCl 溶液中における遠心により、ニワトリ精巢から調製した (Sambrook, J., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edition)。poly(A)リッチRNA をオリゴデックス-dT30 (宝酒造) で精製し、オリゴ-dT プライマー及びランダムプライマーに λ ZAPII (ストラタジーン社) 及び cDNA 合成キット (ファルマシア社) を用いたcDNAライブラリーの作成に使用した。

cDNAライブラリーのスクリーニング

増幅されたcDNAライブラリー (1×10^6 プラーク) をニワトリ胚 PCRフラグメントでスクリーニングした。プラークを移したフィルターを $5 \times \text{SSC}$ 、0.2% SDS、 $5 \times$ デンハルド溶液及び $10 \mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNA 中で ^{32}P - 放射性ラベル化 DNA プローブと 65°C で12時間にわたりハイブリダイズさせた。その後、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中で 65°C 、20分で二回洗浄した。単離されたファージクローンからプラスミドを得るために、ファージミドレスキューを λ ZAPII クローニングキットの製造元 (ストラタジーン社) の使用説明書に従って行った。cDNAインサートは Bluescriptプラスミドとして直接切り取った。プラスミドの作成はサムブルックら (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed.) によって述べられている分子クローニング標準法を用いた。

DNA 配列分析

上記のインサートのDNA 配列は、T7-DNAポリメラーゼの鋳型として一本鎖DNA を用いるジデオキシ鎖停止法 (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977) により決定した。シーケンシング反応及び電気泳動はオートリードDNA シーケンシングキット及びDNA シーケンサー (ファルマシア社) を用いて行った。一本鎖DNA は、ヘルパーファージR408 (ストラタジーン社) で重複感染させた後に大腸菌XL-Blue (ストラタジーン社) から調製した。配列データは PC/Gene (テイジンシステムテクノロジー社) を用いたコンピューターで分析した。

遺伝子の存在を確認するためにニワトリゲノム DNAのサザン・ブロット分析を行った。ニワトリゲノムDNA に対するcDNAインサート pCRB3のハイブリダイゼーションでは、EcoRI による切断からは単一のバンドが、また BamHIによる切断か

らは二本のバンドが得られた。この単純なハイブリダイゼーションパターンによれば、クローニングされたcDNAが単一コピー遺伝子であることが明らかである。厳密度の低い条件下で pCRB3プローブを用いたマウス及びサルからのゲノムDNAのサザンブロット分析では、この遺伝子が種族間で保存されていることが示唆された。サザンブロット分析用には、マウス脳、COS-7 細胞及びニワトリ精巣から調製したゲノミックDNA を各7.5 μ g ずつ制限酵素で切断し、0.6%アガロースゲル上でサイズ分画化したものを用いた。

また、GalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素P-B3遺伝子のmRNAサイズ及び分布をノーザンブロット分析により測定した。3、6、8、10及び12日齢の胚からのRNA 分析により、4.5 kb及び 2.2 kb の2種のRNA の存在が明らかになった。4.5 kbの mRNAは調査した全ての胚ステージにおいて豊富に発現されたが、成体組織には発現されていなかった。2.2 kbの mRNA は初期の胚ステージにおいてはさほど豊富に発現されなかったが、胚ステージ終期及び成体組織においては豊富であった。2.2 kbというトランスクリプトのサイズは、得られたcDNAクローン(λ CEB3-T20)がフルレングスに近いものであったことを示すものである。ノーザンブロット分析用には、ニワトリ胚からの poly(A)リッチRNA 5 μ g 及びニワトリ組織からの全RNA 10 μ g をホルムアルデヒド-アガロースゲル上でサイズ分画化したものを用いた。

従来公知のシアル酸転移酵素は、驚くほど組織特異的発現を示すものであったが、これは細胞型特異的炭化水素構造の存在に相関しているものと考えられている (Paulson, J.C. and Colley, K.J., J. Biol. Chem., 264, pp.17615-17618, 1989)。上記ノーザン・ブロッティングの結果によれば、シアル酸転移酵素P-B3の mRNA の発現パターンが変化することが明らかである。胚期特異的な 4.5Kbの mRNAの正確な構造は明らかではないが、シアル酸転移酵素 P-B3 の遺伝子から2種の異なるサイズのmRNAが転写されることは、それらがGal β 1, 4GlcNAc- α 2, 6-シアル酸転移酵素 (Gal β 4GlcNAc- α 6STRL)およびGal β 1, 3(4)GlcNAc α 2, 3-シアル酸転移酵素 (Gal β 3(4)GlcNAc- α 3STRL)(Weinstein, J. et al., J. Biol. Chem., 262, 17735-17743, 1987; および Wen, D.X. et al., J. Biol. Chem., 267, 21011-21019, 1992)に観察されたような、選択的スプライシングメカニズ

ム及び選択的プロモーター利用メカニズムを通じて発現されることを示唆している。このことは、シアル酸転移酵素 P-B3 に対しては単一コピーの遺伝子しか存在しないことがサザン・ハイブリダイゼーションにより示されていることから明らかである。

シアル酸転移酵素 P-B3 の全長をコードする 1.3 kb DNA フラグメントを、合成オリゴヌクレオチドプライマー (5' - ACGGCGCTCGAGCCAACCCGAGAGCAGCG-3' 及び 5' -CGTTGCCTCGAGAGTCCTTGCAGTGGGACT-3' :下線部は合成 XhoI 部位を示す) を用いて増幅させた。増幅させたDNA フラグメントをXhoIで切断し、発現ベクター pcDSR α のXhoI部位に挿入し (Takebe, Y., Mol. Cell. Biol., 8, pp.466-472, 1988)、組換えプラスミド pcDB3STを得た。このプラスミドインサートの配列を決定し、ポリメラーゼ連鎖反応のエラーの可能性がないことを確認した。

上記の組換えプラスミド pcDB3ST 5 μ g を用いてCOS-7 細胞中にDEAE- デキストラン法によりトランスフェクトした (McCutchan, J.H. and Pagano, J.S., J. Natl. Cancer Inst., 41, 351-357, 1968)。

トランスフェクトの48時間後に培養細胞(1 $\times 10^7$)を回収し、リン酸緩衝食塩水で洗浄した。その後 20mM MnCl₂ 及び 25 mM MES, pH 6.0を含むバッファー2 ml に細胞を再懸濁した。細胞懸濁液を 30,000 \times g で30分間遠心し、得られた細胞ペレットを 0.5 ml の 1% トライトン X-100、50 mM NaCl、5 mM MnCl₂、25 mM MES, pH 6.0 に再懸濁した後、ソニケーターにかけた。30,000 \times g で30分間遠心した後、上清をセントリコン 30 フィルター (アミコン) で10倍に濃縮して以下のアッセイに用いた。

受容体としてグリコプロテイン、オリゴサッカライド、及びグリコリピドを用い反応液として0.1 Mカコジル酸ナトリウムバッファー(pH 6.0)、10 mM MgCl₂、0.5 % トライトン CF54、12 μ M CMP-[¹⁴C]NeuAc (1.5 kBq)、1 mg/ml 受容体基質及び 1 μ l COS 細胞ライセート (総容量10 μ l)を用いてアッセイを行った。反応液を37°Cで1時間インキュベートした後の反応混合液を、グリコプロテインを受容体に用いた場合は SDS-PAGE に付し、オリゴサッカライド及びグリコリピドを受容体に用いた場合はエタノール/1-ブタノール/ピリジン/酢酸/水 (100:10:10:3:30) を溶媒系に用いる HPTLCプレート (メルク社、ダームシュタット、

ドイツ) クロマトグラフィーに付した。シアル化受容体はBAS2000 ラジオイメージアナライザー (富士写真フィルム製、日本) で定量した。

シアル化産物の同定は以下のように行った。還元オリゴサッカライドは、カーelsonの β -除去法(Carlson, D.M., J. Biol. Chem., 243, pp. 616-626, 1968)により、再シアル化グリコプロテインから製造した。pcDB3ST でトランスフェクトされたCOS-7細胞ライセート中でアシアロ BSMを上記と同条件下で CMP-[^{14}C] NeuAc を用いてシアル化した。フェツインから遊離した放射能ラベルされたオリゴサッカライドを NDVシアリダーゼで切断し、さらに生成物を同定するためそれ以上の精製を行わずに薄層クロマトグラフィーに付した。なお、BSM から遊離したオリゴサッカライドを標準として用いた。アシアロ BSM及びアシアロフェツインは、それぞれGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B1 及びGal β 1, 3GalNAc α 2, 3-シアル酸転移酵素(Lee, Y.-C., et al., Eur. J. Biochem., 216, pp. 377-385, 1993)で [^{14}C]-シアル化し、オリゴサッカライドは β -除去により製造した。生成した [^{14}C] NeuAc α 2, 6GalNAc-オール、Gal β 1, 3([^{14}C] NeuAc α 2, 6)GalNAc-オール、及び [^{14}C] NeuAc α 2, 3Gal β 1, 3GalNAc-オールは放射能ラベル化スタンダードとして用いた。

フェツインを受容体として用いた場合には、組換えベクター pcDB3STでトランスフェクトされたCOS-7 細胞のライセートによってのみシアル化された。発現したGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素 P-B3 はフェツイン及びアシアロフェツインに対して強い活性を示し、アシアロBSM に対しては弱い活性を示したが、BSM 又はN-グリコシド結合オリゴサッカライドのみを有する他のグリコプロテイン(例: α 1-酸グリコプロテイン、オボムコイド、アシアロ- α 1 酸グリコプロテイン及びアシアローオボムコイド) に対しては有意の活性を有していなかった(表2)。

さらに、オリゴサッカライド又はグリコスフィンゴリピドは本発明のGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素P-B3に対する受容体としては機能しなかった。該酵素によってフェツイン中に取り込まれた [^{14}C] NeuAc残基は、N-グリカナーゼ又は NDVシアリダーゼによる処理に対して耐性を示した。フェツインから放出された放射能ラベルされたオリゴサッカライドは NDVシアリダーゼによる処理の後、Gal β 1, 3 (NeuAc α 2, 6)GalNAcオールと共移動した。これらの結果は、シアル酸残基がフェ

ツインのO-グリコシド結合オリゴサッカライドのGalNAc残基上の $\alpha 2, 6$ -リンケージを通じて転移されたことを示している。従って、発現された酵素はGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移活性を有していることが明らかである。しかしながら、本発明のGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 P-B3 に対するアシアロBSM の受容体としての機能はフェツイン及びアシアロフェツインと比べると遙かに不十分であった。この受容体基質特異性は、アシアロBSM がアシアロフェツインよりも遙かに良好な受容体として機能するGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 P-B1 の受容体基質特異性とは異なっている。

本発明のGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 P-B3 の基質特異性を明らかにするために、フェツインをシアリダーゼ（コレラ菌）及び β -ガラクトシターゼ（ウシ精巢）で逐次処理し、できたアシアロフェツイン及びアガラクトーアシアロフェツインを受容体として使用した。シアリダーゼ処理されたフェツインへのNeuAc残基の取り込みは天然フェツインへの取り込みの1.5倍に増加した。3個のO-グリコシド結合型オリゴサッカライドがフェツインに含まれていることが知られており、そのうちの2個はNeuAc $\alpha 2, 3$ Gal $\beta 1, 3$ GalNAcであり、残りの1個は、NeuAc $\alpha 2, 3$ Gal $\beta 1, 3$ (NeuAc $\alpha 2, 6$)GalNAcである(Spiro, R.G. and Bhoyroo, V. D., J. Biol. Chem., 249, 5704-5717, 1974)。従って、天然フェツインにおいては3個のO-結合型オリゴサッカライドのうちの2個についてはGalNAc残基が受容体として機能しうるが、一方、アシアロフェツインにおいては全てのO-結合型オリゴサッカライドのGalNAc残基が本発明のGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 P-B3によってシアル化されうるものである。

また、アガラクトーアシアロフェツインは本発明のGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 P-B3 の受容体として機能することができず、さらに、該酵素と共にインキュベートされたアシアロBSM から β -除去により遊離されるオリゴサッカライドについてはGal $\beta 1, 3$ ($[^{14}\text{C}]$ NeuAc $\alpha 2, 6$)GalNAc-オールのみが検出され、 $[^{14}\text{C}]$ -NeuAc $\alpha 2, 6$ -GalNAc-オールは検出されなかった。

以上により明らかにされた本発明のGalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 P-B3 の諸特性をまとめて示せば、以下のとおりである：

(1-i) O-グリコシド結合型(NeuAc $\alpha 2, 3$) Gal $\beta 1, 3$ GalNAc 配列を含むフェツイ

ン及びアシアロフェツイン(Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D., J. Biol. Chem., 249, 5704-5717, 1974)は良好な受容体として機能するが、全炭化水素鎖の 5% しか Gal β 1,3GalNAc 配列を含まないアシアロBSM (Tsuji, T. and Osawa, T., Carbohydr. Res., 151, 391-402, 1986)は受容体としての機能がはるかに不完全である。

(1-ii) Gal β 1,3GalNAc α 1-BzがアシアロGM1(Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,3Glc β 1-Cer)及びGM1b(NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,3Glc β 1-Cer)と同様に受容体として機能しなかったことから、このシアル酸転移酵素の活性に対して蛋白部分は必須である。

(2) β -ガラクトシダーゼで処理したアシアロフェツイン (アガラクト-アシアロフェツイン) に対して活性を示さない。

(3) アシアロBSM の炭化水素鎖の約 60%は GalNAc-O-Ser/Thr である(Tsuji, T. and Osawa, T., Carbohydr. Res., 151, 391-402, 1986)にもかかわらず、[14 C]シアル化アシアロBSM から遊離されたオリゴサッカライド中にはGal β 1,3([14 C]NeuAc α 2,6)GalNAc- オールしか検出されない。

これらの結果は、グリコプロテインのThr/Ser にO-結合したGalNAc残基上に α 2,6 リンケージを持つCMP-NeuAc を転移させる触媒活性を有する本発明の酵素の受容体基質としては、O-グリコシド結合型オリゴサッカライドの Gal β 1,3GalNAc 配列が不可欠であるが、一方、ガラクトース残基に結合した α 2,3 結合型シアル酸残基は必須ではないことを明確に示している。従って、本発明により初めてクローニングされた酵素 P-B3 は新しいタイプのGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素である。分子中央に位置する45アミノ酸範囲 (シアルルモチーフL)からCOOH-末端までの(180-404残基) GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 の一次配列は、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の一次配列と高い配列一致度を示す (第4図: 48% の一致度)。これらのGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素に独特な保存領域は、それらのシアル酸を α 2,6-リンケージによりGalNAc部分に転移させる酵素作用に相関するものであると思われる。

表2 本発明のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 の受容体基質特異性

受容体	特異性
	pmol/h/ μ l 酵素分画
フェツイン	28
アシアロフェツイン	35
BSM	0.5
アシアロBSM	5.2
α 1-酸グリコプロテイン	0
アシアロ α 1-酸グリコプロテイン	1.2
オボムコイド	0
アシアローオボムコイド	1.0
Gal β 1,3GalNAc α 1-Bz	0
GalNAc α 1-Bz	0
GalNAc-SerNAc	0
アシアロGM1	0
GM1b	0
ガングリオシド混合物	0

0 は 0.5 pmol/h より少ないことを示す。

なお、上記の製造例(C) に用いた試薬および試料等は以下のとおりである。フェツイン、アシアロフェツイン、ウシ顎下腺ムチン、 α 1-酸グリコプロテイン、ガラクトース β 1,4-N-アセチルガラクトサミン、CMP-NeuAc、Gal β 1,3GalNAc α 1-Bz、GalNAc α 1-Bz及びトライトンCF-54 はシグマ社(セント・ルイス、USA)から入手した。CMP-[14 C]NeuAc(11GBq/mmol) はアマシャム社(U.K.)から入手したものである。2-アセトアミド、及び2-デオキシガラクトシル α N-アセチルセリン(GalNAc-SerNAc) はグランドラー及びシュミット(Grundler G., and Schmidt R.R., Liebig's Ann. Chem., 1984, 1826-1847, 1984)の方法によって合成した。コレラ菌(*Vibrio cholerae*)由来のNDV-シアリダーゼ及びシアリダーゼは、それぞれオックスフォード・グリコシステムズ社(U.K.)及びベーリンガー・マンハイム社(ドイツ)から購入した。ウシ精巣由来の β -ガラクトシダーゼはベーリンガー・マンハイム社(ドイツ)から入手した。合成プライマーはアブライド・バ

イオシステム 394 DNAシンセサイザーで合成した。制限酵素類は宝酒造から入手したものである。

(D) 微生物中で発現したシアル酸転移酵素の精製

プラスミドの構築

PCR法によりマウス由来の Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 cDNA (Hamamoto, T. et al., Bioorg. Medicin. Chem., 1, 141-145, 1993) に開始コドンとクローニング・サイトを結合した。センスプライマーとして NdeI サイトを含む5'-TGGCATATGGGGAGCGACTATGAGGCTCT-3'、アンチセンスプライマーとして BamHI サイトを含む5'-ATGAGGATCCCTGGCTCAACAGCG-3'を用いた。得られた PCR断片(1152bp)は、開始コドンと酵素の29番目のアミノ酸残基からC-末端までをコードする領域とを含んでおり、サイトゾル・ドメインと経膜ドメインを欠くものである。この PCR断片を発現用ベクター pET3b (Studier, F.W. et al., Method. Enzymol., 185, 60-89, 1990) の NdeI-BamHI 部位 (T7プロモータの下流に位置する) に導入した。得られた組み替えベクターを pET3-MBS と命名した。なお、上記PCR断片の核酸配列を配列表の配列番号4に示す。

酵素の発現

ベクター pET3-MBS をトランスフェクトした大腸菌 JM109(DE3) を 100 μ g/ml のアンピシリンを含む 100 ml の LB 培地を用いて 37°C で培養した。600 nm の光学濃度が 0.2-0.4 に達した時点で、2 mM IPTG (イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド) を加えて T7 RNA ポリメラーゼを誘導し、組み替え蛋白の産生を開始した。細胞質および経膜ドメインを欠く組み替え蛋白が菌体中に不溶性の封入物の形態で蓄積した。pET3-MBS によりトランスフェクトされた大腸菌 JM109 (DE3) の生育速度は、寒天培地上および液体培地中のいずれにおいても、未トランスフェクトの大腸菌 JM109(DE3) の生育速度と同様であった。2 時間培養した後、菌体を集め (湿重量約 1g)、10 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、リゾチーム (0.1 mg/ml) と DNase I (0.01 mg/ml) で 30 分間処理した。Triton X-100 を最終濃度 1% となるように加え、4 °C で 15 分間 12,000 \times g で遠心して不溶分画を集めた。沈殿を 3 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁し、使用時まで -30°C で貯蔵した。

可溶化および脱変性

0.5 ml の上記懸濁液に 0.48 g の固形尿素、60 μ l の 5M NaCl、20 μ l の 1M Tris-HCl (pH 7.4)、および水を加えて最終の容量を 1 ml とした (最終濃度: 8M 尿素; 0.3 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)。沈殿を 10 $^{\circ}$ C で 30 分間抽出し、12,000 \times g で 15 分間遠心した。抽出された蛋白の大部分は 42 k ダルトンの分子量であった。抽出に 5.7 M 尿素バッファーを用いた場合には、80% の蛋白を回収することができた。

8 M 尿素を含む抽出液各 0.1 ml を脱変性用組成物 (標準組成物: 2M 尿素, 0.5M NaCl, 10 mM ラクトース, 0.5 mM EDTA, 及び 20 mM MOPS-NaOH, pH 7.0) 各 1.9 ml で希釈し、最終蛋白濃度を約 0.02 mg/ml とした。溶液を 4 $^{\circ}$ C で 12 時間放置した後、同容量の脱変性用組成物で希釈して尿素濃度を半分にし (約 1.2M)、さらに 4 $^{\circ}$ C で 48 時間放置した。その後、シアル酸転移酵素活性を測定し、この時点で脱変性用組成物の組成の影響を分析した (表 3)。さらに得られた酵素を脱変性用組成物に対して 4 $^{\circ}$ C で 48 時間透析して残存する尿素と還元剤を除去した。得られた試料をセントリコン-30 フィルター (アミコン社製) で約 20 倍に濃縮した。

シアル酸転移酵素のアッセイ

50 μ M CMP-[14 C]-NeuAc (0.9 Bq/pmol) をドナー基質とし、5 mM の Gal β 1.4GlcNAc (N-アセチルラクトサミン) を受容体基質として、シアル酸転移酵素活性を測定した。反応液に 1 mg/ml ウシ血清アルブミン、1 μ l の酵素溶液、および 50 mM カコジル酸ナトリウム (pH 6.0) を加えて最終容量を 10 μ l とし、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。その後、試料をシリカゲル 60 HPTLC プレート (メルク社、ドイツ) にのせ、エタノール:ピリジン:n-ブタノール:酢酸:水 (100:10:10:3:30) を展開溶媒として展開した。各プレート上の放射能活性を BAS2000 ラジオイメージアナライザー (富士写真フイルム社、日本) で定量した (Lee, Y.-C. et al., Eur. J. Biochem., 216, 377-385, 1993)。酵素活性の 1 ユニットは 1 分あたり 1 μ モルのシアル酸転移を触媒する量と定義した。また、分枝オリゴ糖に関して受容体特異性を調べるために、N-アセチルラクトサミン型の 2 分枝ピリジルアミノオリゴ糖を受容体基質として用い、HPLC により蛍光分析した。

8M 尿素による抽出液を 4℃での希釈を行わずに直接透析に付した場合、0.5M 未満の尿素濃度で析出した蛋白の酵素活性はほとんど回復しなかった。2回目の希釈後48時間における最適希釈条件を検討した結果を以下の表3に示す。表中、標準組成物は 2M 尿素、20 mM Tris-HCl、0.3M NaCl、20 mMラクトース、0.5 mM EDTA(pH 7.4)であり、他の組成物は標準組成物と異なる部分のみを示してある。

表3 Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素の脱変性条件の影響

脱変性条件	標準組成物に対する相対活性
標準組成物	1
pH9.5, Tris-HCl 20 mM	0 *
pH8.0, Tris-HCl 20 mM	0.6
pH7.0, MOPS-NaOH 20 mM	2.5
pH6.0, MES-NaOH 20 mM	1.5
0.5 M NaCl	2
0.1 M NaCl	0.2
0.01 M NaCl	0
0 mM ラクトース	0.5
1 M 尿素	1.5
0 M 尿素	0.6

* 0 は標準組成物に比べて 5% 未満であることを示す。

標準組成物において0.5M NaCl (pH 7.0)とした場合に最大の脱変性効果が観られたので、以降の実験ではこの組成物を用いて脱変性を行った。この条件を用いて3回の独立の脱変性を行ったところ、回収された総活性は 0.4-0.8 mU/0.1 ml 抽出物であった。この脱変性ステージの酵素は CMP-NeuAc及びN-アセチルラクツサミンについてそれぞれ 0.14 mMおよび 20 mMの高い K_m 値を与えた。また、試験を行った条件では還元剤 (DTT および β -メルカプトエタノール) は酵素活性を阻害した。これは、アッセイ混合物中に 0.1M 濃度で持ち込まれた尿素の作用によるものと思われる。さらに、2 回目の希釈後 12 時間にはほとんど活性が観

られず、ポリペプチドの再折り畳み過程が試験温度においては非常に遅いことが明らかである。1 μ M および 1 mM の還元剤の存在下に 8M 尿素抽出液を 20 容量の 2M 尿素, 20 mM MOPS-NaOH (pH 7.0), 0.5 M NaCl, 20 mM ラクトース, 0.5 mM EDTA を含む脱変性用組成物で希釈し、試料を 4°C で 12 時間放置した後に再度希釈して尿素の濃度を半分にし、さらに透析により尿素と還元剤を除去した場合、還元剤を使用しない場合とほぼ同じ活性を与えた。結果を以下の表 4 に示す。

表 4

還元剤	酵素活性 (mU/mg)
非使用下	7
1 μ M DTT	6
1 mM DTT	12

また、脱変性させたマウス Gal β 1, 4GlcNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素の基質特異性は、それぞれ 2 mg/ml の基質を用いてアッセイを行った。生成物は HPTLC により分析を行った。受容体としてオリゴ糖および糖蛋白を用いた場合にはエタノール：ピリジン：n-ブタノール：酢酸：水 (100:10:10:3:30) を移動相として用い、糖脂質を受容体として用いた場合はクロロホルム：メタノール：0.5% CaCl₂ (55:45:8) を移動相として用いた。脱変性された酵素の基質特異性と動力学的パラメーターは、ラット肝から得られた酵素のものと同様であった。結果を表 5 および表 6 に示す。

表 5

基 質	Gal β 1,4GlcNAc に対する相対活性	
	脱変性マウス Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	ラット肝 Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素
フェツイン	0.25	0*
アシアロフェツイン	1.5	0.97
α 1 酸性糖蛋白	0.1	0.1
アシアロ α 1 酸性糖蛋白	2.1	1
ウシ顎下腺ムチン	0	0
ウシ顎下腺アシアロムチン	0	0
ラクトN-テトラオース	0	0
Gal β 1,4GlcNAc	1	1
Gal β 1,3GlcNAc	0	0
GalNAc β 1,4Gal	0	0
Gal β 1,4Glc	0	0
Gal	0	0

* 0 は対照に比べて 2% 未満であることを示す。

表 6

基 質	Km (mM)	
	脱変性マウス Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	ラット肝 Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素
CMP-NeuAc*	0.08	0.04
N- アセチルラクトサミン	6.5	5
アシアロオロソムコイド**	0.4	0.2

* N-アセチルラクトサミンを受容体として測定した。

**濃度は末端ガラクトース残基についてのものである。

Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素は、N-アセチルラクトサミン型の2分枝糖蛋白の異なる枝分かれを区別することができる(Joziasse, D.H. et al., J. Biol. Chem., 260, 714-719, 1985; および Van den Eijnden D.H. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 92, 839-845, 1980)。脱シアリル化した2分枝PA-オリゴ糖を本発明の方法により脱変性した酵素によりシアリル化してHPLC分析を行った。アッセイは10 pmolの受容体基質と0.1 mM CMP-NeuAcを用いて最終容量5 μ lとして行った。反応液を37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、冷水90 μ lを加えて反応を停止した。シアリル化されたピリジルアミノオリゴ糖を同定するため、逆相カラム(Shimpack CLC-ODS, 0.6 cm \times 15 cm, 島津製作所)を用いて各反応混合物のHPLC分析を行った。カラムを70% 溶媒A (10 mM リン酸ナトリウム, pH 3.8) および30% 溶媒B (0.5% n-ブタノール, 10 mM リン酸ナトリウム, pH 3.8) で平衡化した後、30分間で溶媒Bが60% になるような直線濃度勾配を用いて55 $^{\circ}$ C 1 ml/分で流出させた。ピリジルアミノオリゴ糖を蛍光分析(励起波長 320 nm, 発光波長 400 nm)により検出したところ、脱変性した酵素は未変性の酵素と同様にMan α 1,6分枝上のガラクトース残基よりもMan α 1,3分枝上のガラクトース残基に対する選択性が高いことが示された。

尿素を完全に除去することにより、脱変性した酵素は還元剤に対する抵抗性を回復した。また、2価カチオンを添加して脱変性を行うことにより10倍以上の活性が回復した。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、尿素の存在下に0.5 mM EDTAを含む透析液に対して長時間透析を行うと、酵素の立体を正しく保持するために酵素に強固に結合している2価カチオンが失われるのかもしれない。1.2 M 尿素を含む脱変性用組成物で脱変性した場合にも2価のカチオンを添加することにより活性が上昇した。得られた結果を表7に示す。表中、活性は試薬無添加のものに対する相対値である。また、5 mM MnCl₂を用いて測定した場合には、脱変性した酵素の比活性は0.15 U/mg蛋白であり、ラット肝から得られた酵素(Weinstein, J. et al, J. Biol. Chem., 257, pp.13835-13844, 1982)の約2%であった。酵素の総収量は0.1 U/100 ml 培養液であった。

表 7

試 薬	脱変性マウス Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	ラット肝 Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素
還 元 剤		
DTT (1 mM)	1.0	0.9
(1 μ M)	1.1	1.2
メルカプトエタノール (1 mM)	1.1	1.1
(1 μ M)	1.0	1.1
界面活性剤		
トライトン X-100 (1 %)	1.5	0.8
(0.5 %)	1.4	1.4
(0.1 %)	1.3	1.3
2 価カチオン		
MgCl ₂ (5 mM)	11	1.0
MnCl ₂ (5 mM)	13	1.1
EDTA (5 mM)	1.7	0.9

以上、本発明の方法を Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素について実施例により具体的に説明したが、本発明の方法はこれらの実施例に限定されることはない。上記のとおり、シアル酸転移酵素類は他のグリコシル転移酵素とは異なり極めて保存性の高い領域（シアリルモチーフ）を有していることが知られており (Livingston, B.D. and Paulson, J.C., J. Biol. Chem., 268, 11504-11507, 1993)、シアル酸転移酵素はすべて類似の高次構造を形成しているものと考えられている (Drickamer, K., Glycobiology, 3, 2-3, 1993)。従って、以上の実施例により明らかにされた Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素の脱変性方法が他のシアル酸転移酵素の脱変性方法に対しても同様の効果を奏することは、当業者は容易に理解されよう。また当業者は、本明細書に記載された本発明の方法を修飾あるいは改変することにより、Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素のみならず他のシアル酸転移酵素を脱変性するための最適な条件を適宜選択することができよう。

なお、上記の例(D)に用いた試薬および試料は以下のとおりである。ラット肝 Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素、フェツイン、アシアロフェツイン、ウシ下顎腺ムチン、 α 1-酸糖蛋白、ガラクトース β 1,3-N-アセチルガラクトサミン、ラクトN-テトラオース、および N-アセチルラクトサミンはシグマ社（セント・ルイス、米国）から入手した。尿素は和光純薬工業（大阪、日本）から入手し、溶液は使用直前に調製した。CMP-[14 C]-NeuAc [11 GBq/mmol]はアマシャム社（英国）から入手したものである。ウシ下顎腺アシアロムチンおよびアシアロ α 1-酸糖蛋白は、対応の糖蛋白を緩和に酸処理することにより製造した。N-アセチルガラクトサミン β 1,4-ガラクトースは梶本博士（理化学研究所、日本国埼玉県和光市）により寄贈されたものを用い、ピリジルアミノオリゴ糖（PA-sugar 001, 021, 022, および 023）は宝酒造（京都、日本）から入手した。蛋白濃度はウシ血清アルブミンを標準としてBCA プロテイン・アッセイ・キット（ピアース社）により決定した。透析チューブ(20/32)はビスカース社のものを用いた。

産業上の利用可能性

本発明により提供される新規GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素P-B1およびP-B3、および該酵素の活性ドメインであるポリペプチド部を有し細胞外に分泌される蛋白は、例えば、蛋白にヒト型の糖鎖を導入する試薬、あるいはヒトに特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療のための医薬として有用である。また、癌転移抑制、ウイルス感染防止、炎症反応抑制を目的とする医薬としても用いることが可能である。さらに、本発明の方法は、シアル酸転移酵素を微生物中で大量に発現させた場合にも、菌体内の凝集物あるいは沈殿物から高度に活性の回復した酵素を大量に回収することができるので有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 2027

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

(-31) CCGAGCTTCCATCTCTCCCGGCCTCTCACT -1

ATG GGG TTT TTA ATC AGA AGG CTT CCT AAA GAT TCC AGA ATA TTC 45

MET Gly Phe Leu Ile Arg Arg Leu Pro Lys Asp Ser Arg Ile Phe 15

CGT TGG CTC CTT ATT TTA ACA GTC TTT TCC TTC ATC ATT ACT AGT 90

Arg Trp Leu Leu Ile Leu Thr Val Phe Ser Phe Ile Ile Thr Ser 30

TTT AGC GCC TTG TTT GGC ATG GAG AAA AGC ATT TTC AGG CAG CTC 135

Phe Ser Ala Leu Phe Gly MET Glu Lys Ser Ile Phe Arg Gln Leu 45

AAG ATT TAC CAA AGC ATT GCA CAT ATG CTA CAA GTG GAC ACC CAA 180

Lys Ile Tyr Gln Ser Ile Ala His MET Leu Gln Val Asp Thr Gln 60

GAT CAG CAA GGT TCA AAC TAT TCT GCT AAT GGG AGA ATT TCA AAG 225

Asp Gln Gln Gly Ser Asn Tyr Ser Ala Asn Gly Arg Ile Ser Lys 75

GTT GGT TTG GAG AGA GAC ATT GCA TGG CTC GAA CTG AAT ACT GCT 270

Val Gly Leu Glu Arg Asp Ile Ala Trp Leu Glu Leu Asn Thr Ala, 90

GTG AGT ACA CCA AGT GGG GAA GGG AAG GAA GAG CAG AAG AAA ACA	315
Val Ser Thr Pro Ser Gly Glu Gly Lys Glu Glu Gln Lys Lys Thr	105
GTG AAA CCA GTT GCC AAG GTG GAA GAA GCC AAG GAG AAA GTG ACT	360
Val Lys Pro Val Ala Lys Val Glu Glu Ala Lys Glu Lys Val Thr	120
GTG AAA CCA TTC CCT GAG GTG ATG GGG ATC ACA AAT ACA ACA GCA	405
Val Lys Pro Phe Pro Glu Val MET Gly Ile Thr Asn Thr Thr Ala	135
TCA ACA GCC TCT GTG GTG GAG AGA ACA AAG GAG AAA ACA ACA GCG	450
Ser Thr Ala Ser Val Val Glu Arg Thr Lys Glu Lys Thr Thr Ala	150
AGA CCA GTT CCA GGG GTG GGG GAA GCT GAT GGG AAG AGA ACA ACG	495
Arg Pro Val Pro Gly Val Gly Glu Ala Asp Gly Lys Arg Thr Thr	165
ATA GCA CTT CCC AGC ATG AAG GAA GAC AAA GAG AAG GCG ACT GTG	540
Ile Ala Leu Pro Ser MET Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Thr Val	180
AAA CCA TCC TTT GGG ATG AAG GTA GCT CAT GCA AAC AGC ACA TCC	585
Lys Pro Ser Phe Gly MET Lys Val Ala His Ala Asn Ser Thr Ser	195
AAA GAT AAA CCA AAG GCA GAA GAG CCT CCT GCA TCA GTG AAA GCC	630
Lys Asp Lys Pro Lys Ala Glu Glu Pro Pro Ala Ser Val Lys Ala	210
ATA AGA CCT GTG ACT CAG GCT GCC ACA GTG ACA GAG AAG AAG AAA	675
Ile Arg Pro Val Thr Gln Ala Ala Thr Val Thr Glu Lys Lys Lys	225
CTG AGG GCT GCT GAC TTC AAG ACT GAG CCA CAG TGG GAT TTT GAT	720
Leu Arg Ala Ala Asp Phe Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe Asp	240

GAT GAG TAC ATA CTG GAT AGC TCA TCT CCA GTA TCG ACC TGC TCT	765
Asp Glu Tyr Ile Leu Asp Ser Ser Ser Pro Val Ser Thr Cys Ser	255
GAA TCA GTG AGA GCC AAG GCT GCC AAG TCT GAC TGG CTG CGA GAT	810
Glu Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp	270
CTT TTC CTG CCG AAC ATC ACA CTC TTC ATA GAC AAG AGT TAC TTC	855
Leu Phe Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe Ile Asp Lys Ser Tyr Phe	285
AAT GTC AGT GAG TGG GAC CGC CTG GAG CAT TTT GCA CCT CCC TAT	900
Asn Val Ser Glu Trp Asp Arg Leu Glu His Phe Ala Pro Pro Tyr	300
GGC TTC ATG GAG CTG AAT TAC TCA CTG GTA GAA GAA GTC ATG TCA	945
Gly Phe MET Glu Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu Glu Val MET Ser	315
CGG CTG CCT CCA AAT CCC CAC CAG CAG CTG CTC CTG GCC AAC AGT	990
Arg Leu Pro Pro Asn Pro His Gln Gln Leu Leu Leu Ala Asn Ser	330
AGC AGC AAC GTG TCA ACG TGC ATC AGC TGT GCT GTT GTG GGG AAT	1035
Ser Ser Asn Val Ser Thr Cys Ile Ser Cys Ala Val Val Gly Asn	345
GGA GGG ATA TTG AAT AAC TCT GGA ATG GGC CAG GAG ATT GAC TCC	1080
Gly Gly Ile Leu Asn Asn Ser Gly MET Gly Gln Glu Ile Asp Ser	360
CAT GAC TAT GTG TTC CGG GTG AGC GGG GCT GTA ATC AAA GGT TAC	1125
His Asp Tyr Val Phe Arg Val Ser Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr	375
GAA AAG GAT GTG GGA ACA AAA ACC TCC TTC TAC GGA TTC ACA GCG	1170
Glu Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr Ser Phe Tyr Gly Phe Thr Ala	390

TAC TCC CTG GTG TCC TCT CTC CAG AAC TTG GGA CAC AAA GGG TTC	1215
Tyr Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn Leu Gly His Lys Gly Phe	405
AAG AAG ATC CCA CAG GGG AAG CAT ATC AGA TAC ATT CAC TTC CTG	1260
Lys Lys Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg Tyr Ile His Phe Leu	420
GAG GCA GTT AGA GAC TAT GAG TGG CTG AAG GCT CTT CTG TTG GAC	1305
Glu Ala Val Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala Leu Leu Leu Asp	435
AAG GAT ATC AGG AAA GGA TTC CTG AAC TAC TAT GGG CGA AGG CCC	1350
Lys Asp Ile Arg Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly Arg Arg Pro	450
CGG GAG AGA TTC GAT GAA GAT TTC ACA ATG AAT AAG TAC CTG GTA	1395
Arg Glu Arg Phe Asp Glu Asp Phe Thr MET Asn Lys Tyr Leu Val	465
GCT CAC CCT GAT TTC CTC AGA TAC TTG AAA AAC AGG TTC TTA AAA	1440
Ala His Pro Asp Phe Leu Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu Lys	480
TCT AAA AAT CTG CAA AAG CCC TAC TGG CGG CTG TAC AGA CCC ACA	1485
Ser Lys Asn Leu Gln Lys Pro Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr	495
ACA GGA GCC CTC CTG CTG CTG ACT GCC CTG CAT CTC TGT GAC CGG	1530
Thr Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu His Leu Cys Asp Arg	510
GTG AGT GCC TAT GGC TAC ATC ACA GAA GGT CAC CAG AAG TAC TCG	1575
Val Ser Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly His Gln Lys Tyr Ser	525
GAT CAC TAC TAT GAC AAG GAG TGG AAA CGC CTG GTC TTC TAC GTT	1620
Asp His Tyr Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg Leu Val Phe Tyr Val	540

AAC CAT GAC TTC AAC TTG GAG AAG CAG GTG TGG AAA AGG CTT CAT 1665
 Asn His Asp Phe Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp Lys Arg Leu His 555

GAT GAG AAC ATC ATG AAG CTC TAC CAG AGA TCC TGA CAG TGT GCC 1710
 Asp Glu Asn Ile MET Lys Leu Tyr Gln Arg Ser --- 566

GAGGGCCATT GCCTGGGAAA TCTCAACAGC ACCTCATGGG GAACAGAAGA 1760
 GGACCTCGGA AGCCAGGGTT AGCTCTGGAC TTCCAGGCCC AGCTTCAGCT 1810
 CCACAGAGAT ATTTCCCTCC TTGATATCT TTATTTTCTC ACAACACTTC 1860
 CTAATATGTG CATATTCTAC AGACCAAGCG AACAGTAGGG AAAAGTGCCT 1910
 CCAAACAAGG TCCCATCTGA CTGTGGACG GTTGTAGGCT CTGGTACTGG 1960
 GAAAGAGGAA TCCGGGATGA ATCCGAATAG CAGATGTTCC AGTGCCCAT 2010
 ATCTTAATCA GGTTCCTCCT CTGCAAGGAG ATGCTCTTGG GGCTGGGGCT 2060
 AGTTTTGCTC TAGGTGGGTT CTCTCTGTGA GTAGTGCTTG TTATGGAGCT 2110
 GGGTGTTTTG GGTAAGCAGT GGATAGAATG GAGACACACA CAATCCTGTC 2160
 TCAAGAGGAT GATTTGTGTC CTGGAGGTGC TGCTGTCACT CTGCTCACTG 2210
 CAGGCATAAG GACCCTTCCA ATGAACTCAA TCCCAATGTG ACTTTGCTGT 2260
 GACACCTCCT GGGGAGCACT GTGATGTCCG TGCCAGCCT GCTGCCCTTG 2310
 GCCTAGTTCA CCATCAGCAC AAGGGAAGGG GAGAGCCCTC CGTAGTGCAG 2360
 CAGAATGCTG GACATTGTAC CTCTTGCTGT GGGTCCCCT GGCTGCAGAC 2410
 TACGTGTAGT GAGTCTGATG AAGAAGCTGG TGCTTGCTG TGCCAGGAGC 2460
 ATGGTGCTTC CTCTTCTACC AGGAGAAATG AGAATTCTCA ATGTCCATGG 2510
 ATGGATGCTG TCTGTCCTTG CTGCTGGCTG GAGTGCCTGC CTACATTGTC 2560
 CTGAGAAAAG CACTGTTACA GCCAGTAAGC CTTGGAGTA TTGGCCTTCT 2610
 GAGTGGGCTT TTGCAAACAA AATAACGGC ACTGCTTTCC CCCAAGCTGA 2660
 AAAAAAAAAA A 2671

配列番号 : 2

配列の長さ : 1294

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

(-43) CTG CAGGGTTTTT ATTTTAATT TTCTTCAAA TACTCCACC -1

PstI

ATG AAA TTC AGC TGG GTC ATG TTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA 45

MET Lys Phe Ser Trp Val MET Phe Phe Leu MET Ala Val Val Thr 15

GGG GTC AAT TCA GAA TTC ACT GAG CCA CAG TGG GAT TTT GAT GAT 90

Gly Val Asn Ser Glu Phe Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe Asp Asp 30

GAG TAC ATA CTG GAT AGC TCA TCT CCA GTA TCG ACC TGC TCT GAA 135

Glu Tyr Ile Leu Asp Ser Ser Ser Pro Val Ser Thr Cys Ser Glu 45

TCA GTG AGA GCC AAG GCT GCC AAG TCT GAC TGG CTG CGA GAT CTT 180

Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp Leu 60

TTC CTG CCG AAC ATC ACA CTC TTC ATA GAC AAG AGT TAC TTC AAT 225

Phe Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Asn 75

GTC AGT GAG TGG GAC CGC CTG GAG CAT TTT GCA CCT CCC TAT GGC 270

Val Ser Glu Trp Asp Arg Leu Glu His Phe Ala Pro Pro Tyr Gly 90

60

70

TTC ATG GAG CTG AAT TAC TCA CTG GTA GAA GAA GTC ATG TCA CGG	315
Phe MET Glu Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu Glu Val MET Ser Arg	105
CTG CCT CCA AAT CCC CAC CAG CAG CTG CTC CTG GCC AAC AGT AGC	360
Leu Pro Pro Asn Pro His Gln Gln Leu Leu Leu Ala Asn Ser Ser	120
AGC AAC GTG TCA ACG TGC ATC AGC TGT GCT GTT GTG GGG AAT GGA	405
Ser Asn Val Ser Thr Cys Ile Ser Cys Ala Val Val Gly Asn Gly	135
GGG ATA TTG AAT AAC TCT GGA ATG GGC CAG GAG ATT GAC TCC CAT	450
Gly Ile Leu Asn Asn Ser Gly MET Gly Gln Glu Ile Asp Ser His	150
GAC TAT GTG TTC CGG GTG AGC GGG GCT GTA ATC AAA GGT TAC GAA	495
Asp Tyr Val Phe Arg Val Ser Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr Glu	165
AAG GAT GTG GGA ACA AAA ACC TCC TTC TAC GGA TTC ACA GCG TAC	540
Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr Ser Phe Tyr Gly Phe Thr Ala Tyr	180
TCC CTG GTG TCC TCT CTC CAG AAC TTG GGA CAC AAA GGG TTC AAG	585
Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn Leu Gly His Lys Gly Phe Lys	195
AAG ATC CCA CAG GGG AAG CAT ATC AGA TAC ATT CAC TTC CTG GAG	630
Lys Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg Tyr Ile His Phe Leu Glu	210
GCA GTT AGA GAC TAT GAG TGG CTG AAG GCT CTT CTG TTG GAC AAG	675
Ala Val Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala Leu Leu Leu Asp Lys	225
GAT ATC AGG AAA GGA TTC CTG AAC TAC TAT GGG CGA AGG CCC CGG	720
Asp Ile Arg Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly Arg Arg Pro Arg	240

GAG AGA TTC GAT GAA GAT TTC ACA ATG AAT AAG TAC CTG GTA GCT	765
Glu Arg Phe Asp Glu Asp Phe Thr MET Asn Lys Tyr Leu Val Ala	255
CAC CCT GAT TTC CTC AGA TAC TTG AAA AAC AGG TTC TTA AAA TCT	810
His Pro Asp Phe Leu Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu Lys Ser	270
AAA AAT CTG CAA AAG CCC TAC TGG CGG CTG TAC AGA CCC ACA ACA	855
Lys Asn Leu Gln Lys Pro Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr Thr	285
GGA GCC CTC CTG CTG CTG ACT GCC CTG CAT CTC TGT GAC CGG GTG	900
Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val	300
AGT GCC TAT GGC TAC ATC ACA GAA GGT CAC CAG AAG TAC TCG GAT	945
Ser Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp	315
CAC TAC TAT GAC AAG GAG TGG AAA CGC CTG GTC TTC TAC GTT AAC	990
His Tyr Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg Leu Val Phe Tyr Val Asn	330
CAT GAC TTC AAC TTG GAG AAG CAG GTG TGG AAA AGG CTT CAT GAT	1035
His Asp Phe Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp Lys Arg Leu His Asp	345
GAG AAC ATC,ATG AAG CTC TAC CAG AGA TCC TGA CAGTGTCCGAG	1080
Glu Asn Ile MET Lys Leu Tyr Gln Arg Ser ---	360
GGCCATTGCC TGGGAAATCT CAACAGCACC TCATGGGGAA CAGAAGAGGA	1175
CCTCGGAAGC CAGGGTTAGC TCTGGACTTC CAGGCCCAGC TTCAGCTCCA	1225
CAGAGATATT TCCCTCCTTT GATATC	1251

EcoRV

配列番号 : 3
 配列の長さ : 1666
 配列の型 : 2 本鎖
 鎖の数トポロジー : 直鎖
 配列の種類 : cDNA to mRNA
 起源 : G. gallus (ニワトリ)
 配列の特徴 : CDS 1-1212
 配列

```

                                -384-TCTTTTGTGTCATCAGTGTA  -361
ATAGGAAGAGCACAAAGTCATTTCTTTCTGCCAATCGCCTTGTGACTCCTTCCGTACATA  -301
TACACGTGTTGTACAGTATGCTTAAACAGTCCTTGATGAGGTCATCGCTTATTTTGTTC  -241
TTTTCTGTGCATAAGAGTTTGGGTTCGCCGGAATTCCGGCTAGCCTTGGAGAAGCAG  -181
CGAGTCTGAACCAGTCCGCCCAGCGCTCCTCCTCCGGCTCACACCCTCCTTCCCTCCACC  -121
GCTCCTCGGAACATCCATCGCTCCGTCCGTCCATCCGTCCATCCCGGCTGCGGGGA  -61
GCAGCGGAGCGCCGCGCTTCGGATCCACGCGGACGGCGGACCCAACCCGGAGAGCAGCG  -1

ATG GGT TCC CCC CGC TGG AAG CGT TTC TGC TTC TTG CTC CTC GCA  45
MET Gly Ser Pro Arg Trp Lys Arg Phe Cys Phe Leu Leu Leu Ala  15

GCC TTC ACC TCG TCC CTT CTG CTC TAC GGG CAC TAC TAC GCT ACG  90
Ala Phe Thr Ser Ser Leu Leu Leu Tyr Gly His Tyr Tyr Ala Thr  30

GTG GAC GTG CGC AGC GGC CCG AGG GTC GTG ACC AGC CTG CTG CAG  135
Val Asp Val Arg Ser Gly Pro Arg Val Val Thr Ser Leu Leu Gln  45

CCA GAG CTG CTG TTC CTG GTC CGC CCA GAC ACC CCA CAC CCA GAC  180
Pro Glu Leu Leu Phe Leu Val Arg Pro Asp Thr Pro His Pro Asp  60
  
```

AAC AGC CAC CAC AAG GAG CTC AGA GGG ACT GTG AAG AGC AGG GAG	225
Asn Ser His His Lys Glu Leu Arg Gly Thr Val Lys Ser Arg Glu	75
TTC TTC TCC CAA CCA TCC TCA GAG CTG GAG AAG CCC AAA CCC AGT	270
Phe Phe Ser Gln Pro Ser Ser Glu Leu Glu Lys Pro Lys Pro Ser	90
GGA AAG CAG CCC ACC CCG TGC CCC CGC TCG GTG GCA GCC ACG GCG	315
Gly Lys Gln Pro Thr Pro Cys Pro Arg Ser Val Ala Ala Thr Ala	105
AAG GCA GAC CCC ACG TTT GGG GAG CTC TTC CAA TTT GAC ATC CCG	360
Lys Ala Asp Pro Thr Phe Gly Glu Leu Phe Gln Phe Asp Ile Pro	120
GTG CTG ATG TGG GAC CAA CAC TTC AAC CCT GAG ACG TGG GAC AGG	405
Val Leu Met Trp Asp Gln His Phe Asn Pro Glu Thr Trp Asp Arg	135
CTG AAG GCA CGA CGC GTC CCA TAC GGC TGG CAG GGT TTG TCC CAA	450
Leu Lys Ala Arg Arg Val Pro Tyr Gly Trp Gln Gly Leu Ser Gln	150
GCA GCT GTC GCC AGC ACC CTG CGT CTC CTT AAC ACC TCC TCC AAC	495
Ala Ala Val Gly Ser Thr Leu Arg Leu Leu Asn Thr Ser Ser Asn	165
ACG CGG CTC TTC GAC CGC CAC CTC TTC CCC GGG GGC TGC ATC CGC	540
Thr Arg Leu Phe Asp Arg His Leu Phe Pro Gly Gly Cys Ile Arg	180
TGT GCC GTG GTG GGC AAT GGG GGA ATC CTC AAC GGC TCA CGG CAG	585
Cys Ala Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Gly Ser Arg Gln	195
GGC CGG GCC ATC GAC GCA CAT GAT TTG GTC TTC AGG CTG AAC GGG	630
Gly Arg Ala Ile Asp Ala His Asp Leu Val Phe Arg Leu Asn Gly	210

GCC ATC ACC AAA GGC TTT GAG GAG GAT GTT GGG AGC AAG GTT TCG	675
Ala Ile Thr Lys Gly Phe Glu Glu Asp Val Gly Ser Lys Val Ser	225
TTC TAC GGC TTC ACG GTG AAC ACC ATG AAG AAC TCA CTC ATT GCC	720
Phe Tyr Gly Phe Thr Val Asn Thr Met Lys Asn Ser Leu Ile Ala	240
TAT GAG GCG TAT GGC TTC ACC CGG ACA CCG CAG GGC AAG GAC CTG	765
Tyr Glu Ala Tyr Gly Phe Thr Arg Thr Pro Gln Gly Lys Asp Leu	255
AAG TAC ATC TTC ATC CCC TCG GAC GCA CGC GAC TAC ATC ATG CTG	810
Lys Tyr Ile Phe Ile Pro Ser Asp Ala Arg Asp Tyr Ile Met Leu	270
AGG TCG GCC ATT CAG GGC AGC CCA GTC CCC GAG GGC TTG GAC AAG	855
Arg Ser Ala Ile Gln Gly Ser Pro Val Pro Glu Gly Leu Asp Lys	285
GGC GAC GAG CCA CAG AAG TAT TTT GGA CTG GAG GCA TCT GCG GAG	900
Gly Asp Glu Pro Gln Lys Tyr Phe Gly Leu Glu Ala Ser Ala Glu	300
AAG TTC AAG CTG CTG CAT CCC GAT TTC TTG CAT TAC CTG ACA ACC	945
Lys Phe Lys Leu Leu His Pro Asp Phe Leu His Tyr Leu Thr Thr	315
AGG TTC CTG AGG TCA GAG CTC CTG GAC ATG CAG TAC GGC CAC CTC	990
Arg Phe Leu Arg Ser Glu Leu Leu Asp Met Gln Tyr Gly His Leu	330
TAC ATG CCC AGC ACT GGG GCA CTC ATG CTG CTG ACA GCA CTG CAC	1035
Tyr Met Pro Ser Thr Gly Ala Leu Met Leu Leu Thr Ala Leu His	345
ACC TGC GAC CAG GTC AGT GCC TAC GGG TTC ATC ACA GCC AAC TAC	1080
Thr Cys Asp Gln Val Ser Ala Tyr Gly Phe Ile Thr Ala Asn Tyr	360

GAG CAG TTC TCC GAC CAT TAC TAC GAG CCA GAG AAG AAG CCA CTG	1125
Glu Gln Phe Ser Asp His Tyr Tyr Glu Pro Glu Lys Lys Pro Leu	375
GTG TTC TAC GCC AAC CAC GAC ATG CTG CTG GAA GCA GAG CTG TGG	1170
Val Phe Tyr Ala Asn His Asp Met Leu Leu Glu Ala Glu Leu Trp	390
AGG AGT TTG CAC CGG GCG GGG ATC ATG GAG CTG TAC CAG CGG TGA	1215
Arg Ser Leu His Arg Ala Gly Ile Met Glu Leu Tyr Gln Arg ---	404
GGGCAGCGCAGTCCCACTGCAAGGACTCTCAATGCAACGCAGAAGCGGTTCTCCTCTTTC	1275
CTGAAGGCCTCCTTCTGTCCCTGGAGGGCTCTCCCACTGGCGGGCCAGCCTGAGGAGC	1335
AGGGCCTGCAGCTGACAGCAGAGCAAAGGTGGTGGTGCAGGGCGAGCCAAGGCTGGCAGG	1395
GAAATACTGCAACTCCTCAGGGCCCTTCAGCATCTTATTTGTGACTCTGAGACTGAGCAC	1455
GGCCTTGGGGAGCCTCCGCACGTGGCTGTGAGCTCCTGATGCCATGAGAATGTCTGTGGG	1515
GTGGCAGCAGCCCCTGGGAAGCACAGTGTTTCATGTGCAGGTGGGGCACAGTGGTGCTGGA	1575
AGGGGATGCTGGAGAAGCATACATCTGACAGACCTCACTTCTTGGAATTCCTGGAGTTG	1635
CAGCCTCGAAGTCACGCTGGGTAGGCTGCAG	1666

配列番号 : 4

配列の長さ : 1152

配列の型 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖

配列の種類 : DNA

起源 : マウス

配列の特徴 : 1 ~ 1128 可溶型シアル酸転移酵素

配列

(-6) TGGCAT -1

NdeI

ATG GGG AGC GAC TAT GAG GCT CTT ACA TTG CAA GCC AAG GTA TTC 45

MET Gly Ser Asp Tyr Glu Ala Leu Thr Leu Gln Ala Lys Val Phe 15

CAG ATG CCG AAG AGC CAG GAG AAA GTG GCC GTG GGG CCT GCT CCC 90

Gln MET Pro Lys Ser Gln Glu Lys Val Ala Val Gly Pro Ala Pro 30

CAG GCT GTG TTC TCA AAC AGC AAA CAA GAC CCT AAG GAA GGC GTT 135

Gln Ala Val Phe Ser Asn Ser Lys Gln Asp Pro Lys Glu Gly Val 45

CAG ATC CTC AGT TAC CCC AGG GTC ACA GCC AAG GTC AAG CCA CAG 180

Gln Ile Leu Ser Tyr Pro Arg Val Thr Ala Lys Val Lys Pro Gln 60

CCC TCC TTG CAG GTG TGG GAC AAG GAC TCC ACA TAC TCA AAA CTT 225

Pro Ser Leu Gln Val Trp Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Lys Leu 75

AAC CCC AGG CTG CTG AAG ATC TGG AGG AAC TAT CTG AAC ATG AAT 270

Asn Pro Arg Leu Leu Lys Ile Trp Arg Asn Tyr Leu Asn MET Asn 90

AAA TAT AAA GTG TCC TAC AAG GGG CCG GGA CCA GGA GTC AGG TTC	315
Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly Pro Gly Pro Gly Val Arg Phe	105
AGC GTA GAA GGC CTG CGC TGC CAC CTT CGA GAC CAC GTG AAT GTG	360
Ser Val Glu Gly Leu Arg Cys His Leu Arg Asp His Val Asn Val	120
TCT ATG ATA GAG GCC ACA GAT TCT CCC TTC AAC ACC ACT GAA TGG	405
Ser MET Ile Glu Ala Thr Asp Ser Pro Phe Asn Thr Thr Glu Trp	135
GAG GGT TAC CTG CCC AAA GAG ACA TTC AGA ACC AAG GCT GGG CCT	450
Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Thr Phe Arg Thr Lys Ala Gly Pro	150
TGC ACA AAG TGT GCC GTC GTG TCT TCT GCA GGA TCT CTG AAG AAC	495
Cys Thr Lys Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser Leu Lys Asn	165
TCC CAG CTG GGT CGA GAG ATT GAT AAT CAT GAT GCG GTC CTG AGG	540
Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asn His Asp Ala Val Leu Arg	180
TTT AAT GGG GCA CCT ACA GAC AAC TTC CAA CAG GAT GTG GGC ACA	585
Phe Asn Gly Ala Pro Thr Asp Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly Thr	195
AAA ACT ACC ATC CGC CTA GTG AAC TCT CAG TTA GTC ACC ACA GAA	630
Lys Thr Thr Ile Arg Leu Val Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu	210
AAG CGC TTC CTG AAG GAC AGT TTG TAC ACC GAA GGA ATC CTG ATT	675
Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Thr Glu Gly Ile Leu Ile	225
CTG TGG GAC CCA TCT GTG TAT CAT GCA GAC ATT CCG CAG TGG TAT	720
Leu Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ala Asp Ile Pro Gln Trp Tyr	240

CAG AAG CCA GAC TAC AAC TTC TTC GAA ACC TAT AAG AGT TAC CGA	765
Gln Lys Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Glu Thr Tyr Lys Ser Tyr Arg	255
AGG CTT CAC CCC AGC CAG CCT TTT TAC ATC CTC AAG CCC CAG ATG	810
Arg Leu His Pro Ser Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln MET	270
CCA TGG GAA CTA TGG GAC ATC ATT CAG GAA ATC TCT CCA GAT CTG	855
Pro Trp Glu Leu Trp Asp Ile Ile Gln Glu Ile Ser Pro Asp Leu	285
ATT CAG CCG AAT CCC CCA TCC TCC GGC ATG CTG GGT ATC ATC ATT	900
Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly MET Leu Gly Ile Ile Ile	300
ATG ATG ACG CTG TGT GAC CAA GTT GAT ATT TAC GAG TTC CTC CCA	945
MET MET Thr Leu Cys Asp Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro	315
TCC AAG CGC AAG ACA GAT GTG TGC TAC TAT CAC CAG AAG TTC TTT	990
Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val Cys Tyr Tyr His Gln Lys Phe Phe	330
GAC AGC GCC TGC ACG ATG GGT GCC TAC CAT CCG CTC CTC TTC GAG	1035
Asp Ser Ala Cys Thr MET Gly Ala Tyr His Pro Leu Leu Phe Glu	345
AAG AAT ATG GTG AAG CAT CTC AAT GAG GGA ACA GAT GAA GAC ATT	1080
Lys Asn MET Val Lys His Leu Asn Glu Gly Thr Asp Glu Asp Ile	360
TAT TTG TTT GGG AAA GCT ACC CTG TCT GGC TTC CGG AAC AAT CGC	1125
Tyr Leu Phe Gly Lys Ala Thr Leu Ser Gly Phe Arg Asn Asn Arg	375
TGT TGA GCCAGGGATCCTCAT	1146
Cys --- BamHI	376

請 求 の 範 囲

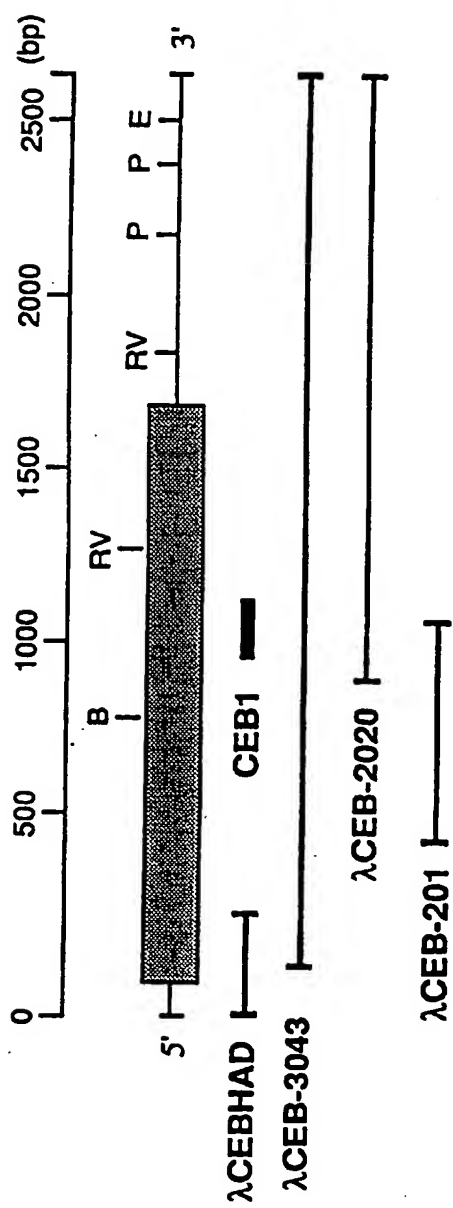
1. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列により特定されるGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1。
2. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 遺伝子。
3. 配列表の配列番号 1 に示される核酸番号 1 から1698により特定される塩基配列を有する請求の範囲第 2 項に記載のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子。
4. 配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列により特定されるGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3。
5. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 遺伝子。
6. 配列表の配列番号 3 に示される核酸番号 1 から 1212 で特定される塩基配列を有する請求の範囲第 5 項に記載のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 遺伝子。
7. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。
8. プラスミド λ CEB-3034である請求の範囲第 7 項に記載の組み換えベクター。
9. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。
10. プラスミド λ CEB3-T20 またはプラスミド pcDB3ST である請求の範囲第 9 項に記載の組み換えベクター。
11. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。
12. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B3 のアミノ酸配列をコードするGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。
13. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポ

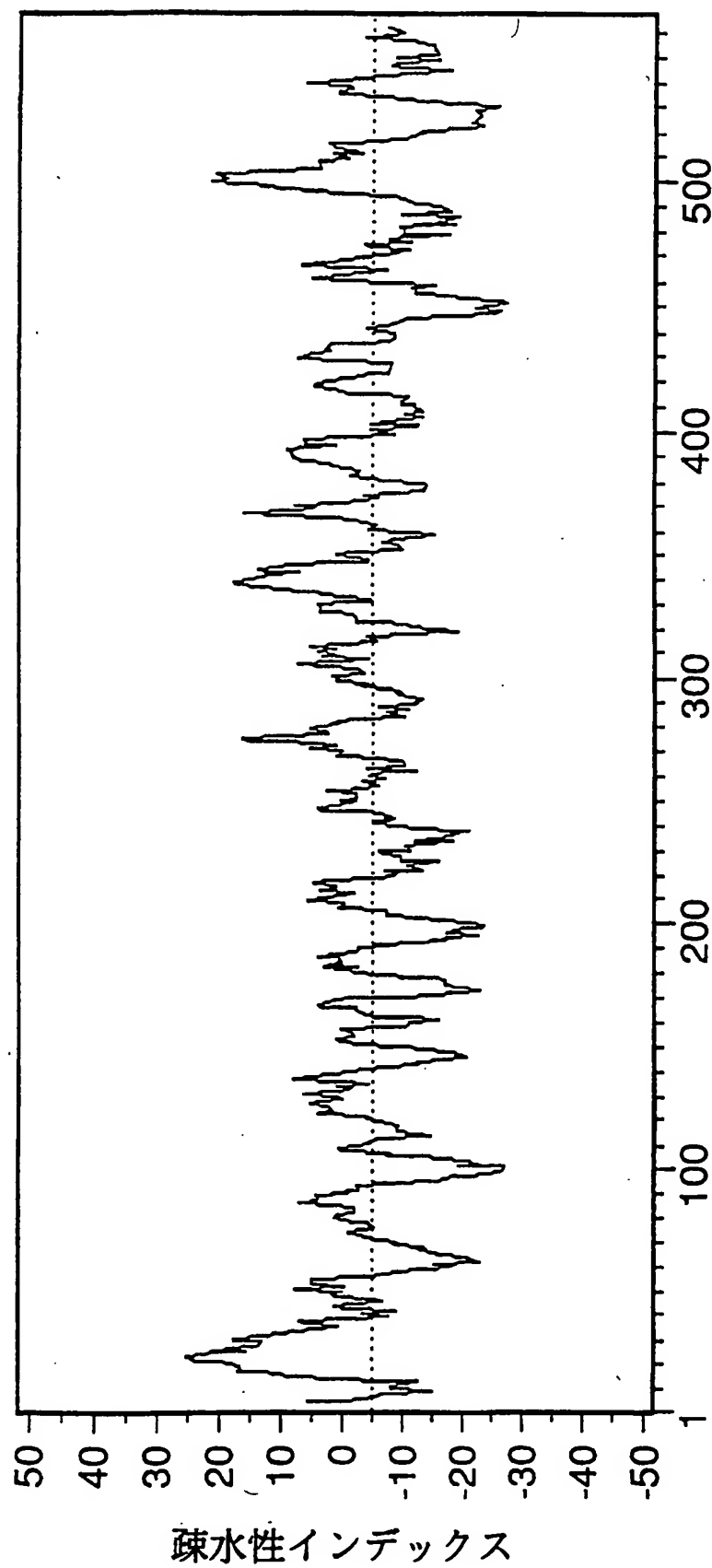
- リペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白。
14. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 の活性ドメインが配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の233-566 により特定されるポリペプチドである請求の範囲第13項記載の蛋白。
15. 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列により特定される請求の範囲第 13項に記載の蛋白 SB-690 。
16. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白をコードする遺伝子。
17. 配列表の配列番号 2 に示される核酸番号 1 から1065で示される塩基配列を有する請求の範囲第16項に記載の遺伝子。
18. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白をコードする遺伝子を含む組み換えベクター。
19. プラスミド pcDSB-690である請求の範囲第18項に記載の組み換えベクター。
20. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白をコードする遺伝子を含む組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。
21. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白をコードする遺伝子を含む組み換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、培養物から該蛋白を採取することを特徴とする、GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 P-B1 または P-B3 の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であってGalNAc α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白の製造方法。
22. GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素。

23. 哺乳類動物由来のGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素。
24. シアル酸転移酵素の製造方法であって、以下の工程：
- (a) シアル酸転移酵素を微生物中で発現させる工程；
 - (b) 菌体内に蓄積するシアル酸転移酵素を含む蛋白凝集物または沈殿物から該酵素を 5～9Mの尿素により抽出する工程；
 - (c) 工程(b) で得られた抽出物を脱変性用組成物で希釈して 1～4 M の尿素を含む 1次希釈物を得る工程；
 - (d) 工程(c) で得られた 1次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈して 0.5～2 M の尿素を含む 2次希釈物を得る工程；および
 - (e) 工程(d) で得られた 2次希釈物を 2価のカチオンの存在下で透析して尿素を除去し脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含む方法。
25. 工程(c) で用いる脱変性用組成物が 1～2M 尿素, 20 mM MOPS-NaOH, 0.5M NaCl, 20 mM ラクトース, 0.5 mM EDTA (pH 7.0)を含み、工程(d) で用いる脱変性用組成物が 20 mM MOPS-NaOH, 0.5M NaCl, 20 mMラクトース, 0.5 mM EDTA (pH 7.0)を含む、請求の範囲第24項に記載の方法。
26. シアル酸転移酵素がGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素または Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素である請求の範囲第24項に記載の方法。
27. シアル酸転移酵素の製造方法であって、以下の工程：
- (a) シアル酸転移酵素を微生物中で発現させる工程；
 - (b) 菌体内に蓄積するシアル酸転移酵素を含む蛋白凝集物または沈殿物から該酵素を 8M の尿素により抽出する工程；
 - (c) 工程(b) で得られた抽出物を脱変性用組成物で希釈した後に 4℃で 12 時間以上放置して 2～3 M の尿素を含む 1次希釈物を得る工程；
 - (d) 工程(c) で得られた 1次希釈物をさらに脱変性用組成物で希釈した後に 4 8 時間以上放置して 1～2 M の尿素を含む 2次希釈物を得る工程；および
 - (e) 工程(d) で得られた 2次希釈物を 2価のカチオンの存在下で透析して尿素を除去し脱変性シアル酸転移酵素を得る工程を含む方法。

28. 工程(c) で用いる脱変性用組成物が 1～ 2M 尿素, 20 mM MOPS-NaOH, 0.5M NaCl, 20 mM ラクトース, 0.5 mM EDTA (pH 7.0)を含み、工程(d) で用いる脱変性用組成物が 20 mM MOPS-NaOH, 0.5M NaCl, 20 mMラクトース, 0.5 mM EDTA (pH 7.0)を含む、請求の範囲第27項に記載の方法。
29. シアル酸転移酵素がGalNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素または Gal β 1, 4GlcNAc α 2, 6-シアル酸転移酵素である請求の範囲第27項に記載の方法。

第1図

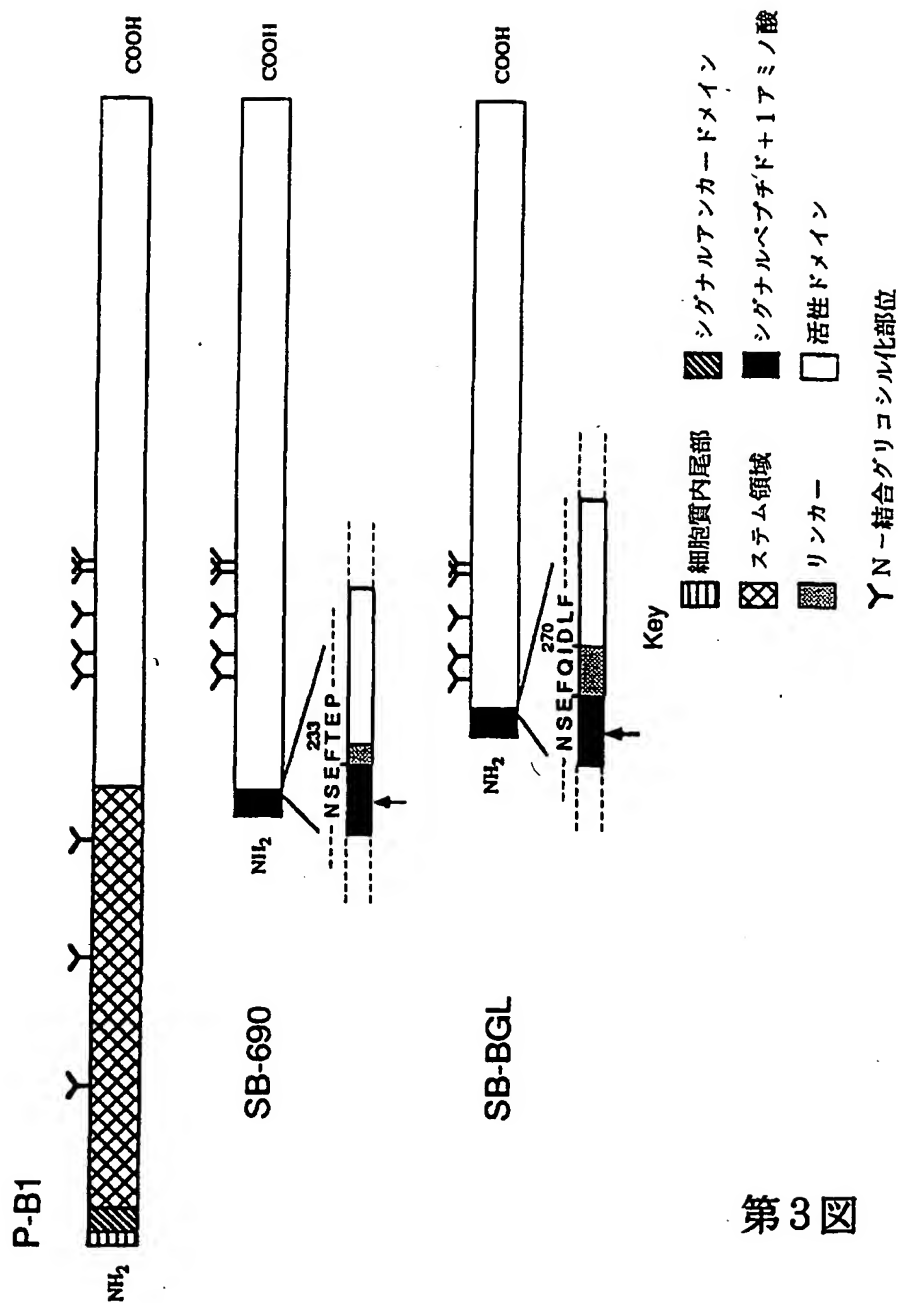




第2図

アミノ酸残基

疎水性インデックス



第3図

第4図

P - B3 - MG-----SPRWKRECEIILAAFTSSLLLYCHYYATVDVRS GPRVVTSLLOPELLFLVRPDTPHPDNSHHKELRGTVKSREFFSQPSSELEKPKPSG - 91
 P - B1 - MGFLIRRLPKDSRIFRMLLILVFESELTSESALFGEKSI FRQLKIYQSI AHMLQVDTQDQOQSNYSANGRI SKVGLERDIAWLELNTAVSTPSGEGKE - 100
 P - B3 - KQTPCPRSVAATAKADPTGELFQFDIPVLM----- - 123
 P - B1 - EQKKTVPVARVEEAKERTVKPFPEVMGITNTTASTASWVERTKEKTTARPFVGVGEADGKRTTIALPSMKEDKEKATVKPSFGMKVAHANSTSKDKPK - 200
 P - B3 - ----- - 123
 P - B1 - AEPPASVKAIRPVTQAAATVTEKKKLRAADFKTEPQWDFDDEYILDSSPVSTCSESVRAKAAKSDWLRDLFLPNTILFIDKSYFNVSEWDRLEHFAPPY - 300
 P - B3 - WDQHFNPE TWDR LKARRVPYGWQGLSOAAVGSTLRLEDRHLFPGCCIRCAVVNGGCIILNGSRQGRAIDAHDLVFRNLNGAITKGFEEDVGSKVSFYGFTVN - 223
 P - B1 - GFMEINYSILVEEVM SRLPPNPHQQLLLANSSSNVSTINTSSNTRLCISCAVVNGGCIILNNSGMGOEIDSHDYVFRVSGAVIKGYEKDVGTKTSFYGFTAY - 400
 P - B3 - TMKNSLIAYEAYGFTRTPOGKDLKYIFIPSDARDYIMLRSAIQGSPVEG-LDKGDEPQKYFGLEASAEKFKLL-HPDFLHYLTTRFLRSELDMOYGHIL - 321
 P - B1 - SLVSSLQNLGHKGFKKIPQGGKHRYIHFELEAVROYEWL KALLLDKDIRKGFLNYYGRRPRERFDEFTMNKYLVAHPDFLRYLKNRFLKSKNLQKPYWRL - 500
 P - B3 - YMPSTGALMLLTALHTCDQVSAYGFTTANYEQFSDHYEPEKKPLVFYANHDM LLEAELWRS LHRAGIMELYQR - 404
 P - B1 - YRPTTGALLLLTALHLCDRVSA YGFTTEGHQKYS DHYDREWKRLV FYVNHDFNLEKQVWKRLHDENIMKLYQRS - 566

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.